

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIZIANE CRISTINA CAMPOS BRUSAMARELLO DOS SANTOS

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA TOTAL DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.) COLONIZADAS POR *Herbaspirillum seropedicae* SmR1**

CURITIBA
2013

LIZIANE CRISTINA CAMPOS BRUSAMARELLO DOS SANTOS

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA TOTAL DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE
ARROZ (*Oryza sativa* L.) COLONIZADAS POR *Herbaspirillum seropedicae* SmR1**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Bioquímica.

Orientador: Prof Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Roseli Wassem

CURITIBA
2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Santos, Liziane Cristina Campos Brusamarello dos
Análise do transcriptoma total de raízes de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) colonizadas por *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. / Liziane Cristina Campos Brusamarello dos Santos. – Curitiba, 2013.
111f. : il. ; 30cm.

Orientador: Emanuel Maltempi de Souza
Co-orientadora: Roseli Wassem

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Transcriptoma. 2. Herbaspirillum. 3. Oryza sativa. I. Título II. Souza, Emanuel Maltempi de III. Wassem, Roseli IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

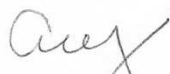
LIZIANE CRISTINA CAMPOS BRUSAMARELLO DOS SANTOS

Análise do transcriptoma total de raízes de plântulas de arroz
(*Oryza sativa* L.) colonizadas por *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Tese aprovada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências-
Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca
examinadora:



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof.^a Dr.^a Adriana Silva Hemerly
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ



Prof.^a Dr.^a Aline Maria da Silva
Instituto de Química - USP



Dr. Francisco Adriano de Souza
Embrapa Milho e Sorgo – Núcleo de Biologia Aplicada



Prof.^a Dr.^a Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 13 de agosto de 2013.

Aos meus pais Dejanira e Benedito J. Brusamarello e
Ao meu esposo Alcides J.F.dos Santos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força espiritual e por iluminar meus pensamentos.

Aos meus orientadores, primeiramente por terem aberto as portas da UFPR para mim, aceitando-me em um estágio de férias e posteriormente no mestrado e doutorado. Agradeço por confiarem em mim este projeto, que inicialmente foi um grande desafio, mas com o direcionamento certo aos poucos fomos superando cada obstáculo. Muito obrigada pelos anos de convivência, por tudo o que me ensinaram e pela minha formação científica. Vocês são para mim um exemplo de dedicação e amor a ciência que levarei sempre comigo.

Ao Instituto Riograndense do Arroz (IRGA) por cordialmente disponibilizar as sementes de arroz para a realização deste estudo.

Aos Pós-Doutorandos Helisson Faoro, Michelle Z. Tadra Sfeir, Gláucio Valdameri, Prof. Dr. Doumit Camilios-Neto, Kátia P. Lopes, Rafael Covre e Prof. Dr. Adriano B. Silva pela colaboração em algumas etapas desse trabalho.

Aos amigos da bioinformática que muito me ajudaram e ensinaram Rodrigo Luis Alves Cardoso, Daniel Renato Lammel e Vinicius Weiss.

Aos professores e alunos membros do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela atenção e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante esses anos e aos que me acompanham há algum tempo. Em especial aos novos amigos: Vania Pankievicz, Karina Nogueira, Doumit Camilios Neto, Dayane Alberton, Vivian e Gláucio Valdameri, Geisa e Joseph Evaristo, Monica Kangussu, Normanda Melo, Letícia Laibida, Maria Isabel Stets e Sarah Thimóteo. Por todo apoio e amizade e por tudo que aprendi com vocês, meu muito obrigada.

Aos técnicos, Roseli Prado, Valer Baura, Alexsandro Albani e Marilza Lamour, pela amizade e apoio técnico nos experimentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e demais agências financiadoras, CAPES e INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio.

“Em informações aparentemente desordenadas e mesmo caóticas, o cientista pode descobrir uma ordem esplendorosa, em que impera a beleza sem par que o Universo mostra, escondendo.”

Newton Freire Maia

RESUMO

O arroz é alimento básico para aproximadamente metade da população mundial. O aumento desta população, portanto, demanda de uma maior produção de arroz. Nesse sentido, o melhoramento na cultura deste cereal e novas tecnologias de cultivo é de suma importância para aumentar a produtividade sem aumento da área de plantio. *Herbaspirillum seropedicae* coloniza arroz e outras plantas e promove o seu crescimento e produtividade. Os mecanismos envolvidos nessa interação benéfica entre *H. seropedicae* e plantas de arroz não são bem compreendidos e fatores moleculares envolvidos permanecem desconhecidos. Para compreender melhor essa interação, o transcriptoma de raízes de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) inoculadas e não inoculadas com *H. seropedicae* foi determinado. Para isto foi utilizado técnica de sequenciamento de cDNA (RNA-seq) em uma plataforma de sequenciamento SOLiDTM. O mapeamento da biblioteca de RNA-seq de raízes de arroz 3 dias após inoculação produziu um total de 22 milhões de sequências mapeadas apenas uma vez no genoma de *O. sativa* representando 13.838 transcritos expressos com pelo menos duas vezes de cobertura do gene. Foram obtidos 1019 genes diferencialmente expressos (valor- $p < 0,05$), sendo que destes 256 possuem diferença de expressão entre controle e inoculado de pelo menos duas vezes. Entre os genes regulados observou-se um grande número de genes codificando proteínas relacionadas ao sistema de defesa da planta, tais como, proteínas induzidas por probenazol, proteínas de resistência a doenças e enzimas envolvidas na biossíntese de flavonóides. Todos esses genes estão reprimidos pela presença de *H. seropedicae* em raízes de arroz. Além disso, genes relacionados à síntese e efluxo de fitossideróforos (PS) e transporte do complexo PS-Fe foram induzidos em raízes de arroz. Genes relacionados à via de sinalização de auxina e a 1-aminociclopropano oxidase, que catalisa a biossíntese de etileno, também são regulados pela inoculação com *H. seropedicae*. As leituras de sequências foram também mapeadas no genoma de *H. seropedicae*. Genes relacionados à fixação de nitrogênio, motilidade celular e biogênese da parede celular foram expressos pela bactéria. Os resultados indicam que o sistema de defesa da planta é reprimido pela presença da bactéria enquanto que o sistema de aquisição de Fe está ativado. Os resultados obtidos e as vias metabólicas discutidas neste trabalho poderão contribuir para elucidar o mecanismo de interação planta-bactéria.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Transcriptoma. RNA-seq. *Herbaspirillum seropedicae*.

ABSTRACT

Rice is the staple food for nearly half of world's population. Improvement in the production of this cereal culture is important to attend the increasing global demand for food. *Herbaspirillum* spp. colonizes rice and promotes plant growth and productivity. The mechanisms underlying the interaction *Herbaspirillum seropedicae*-plants are not well understood and molecular factors involved remain unknown. The transcriptome of inoculated and non-inoculated rice roots (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) with *H. seropedicae* was determined after 3 days by RNA-seq in a SOLiD™ platform. Mapping of 121 million reads against the *O. sativa* genome produced a total of 22 million of unique mapped reads, representing 13,838 expressed transcripts of rice roots with at least 2X coverage. 1019 genes were differentially regulated (p-value lower than 0.05) and 256 of these with fold change \geq |2|. Among the regulated genes we observed several coding for proteins related to plant defense, such as putative probenazole inducible protein, plant disease resistance proteins and enzymes involved in flavonoid biosynthesis. All these genes were repressed in *H. seropedicae* inoculated rice roots. In addition, genes related to synthesis and efflux of phytosiderophores (PS) and transport of PS-iron complex were induced by bacteria. Furthermore, a transcript encoding an auxin-responsive protein was induced 2.5-fold, whereas a gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, that catalyses the ethylene biosynthesis, was 2.0-fold repressed. The reads were also mapped to the *H. seropedicae* genome and showed that genes related to nitrogen fixation, cell motility and cell wall biogenesis were expressed. The results indicate that rice defense system is repressed by the presence of the bacteria and the iron uptake system seems to be activated. The results obtained will help to elucidate the molecular factors and their roles in this plant-bacteria interaction.

Key words: *Oryza sativa*. Transcriptome. RNA-seq. *Herbaspirillum seropedicae*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E SEUS BENEFÍCIOS.....	12
2.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	13
2.3 A RESPOSTA DA PLANTA A INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	16
2.4 TRANSCRIPTOMA POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNA-seq).....	19
2.5 TRANSCRIPTOMA DO ARROZ.....	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (ESTs) DE ARROZ 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM <i>H. seropedicae</i>	23
4.2 QUANTIFICAÇÃO DO mRNA POR RT-qPCR.....	23
4.3 CULTIVO E INOCULAÇÃO DE <i>Oryza sativa</i>	26
4.3.1 <i>Oryza sativa</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	26
4.3.2 Desinfecção superficial das sementes.....	26
4.3.3 Cultura de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> para inoculação das plântulas de arroz.....	27
4.3.4 Condições de cultivo das plantas de arroz.....	27
4.3.5 Colonização de plântulas de arroz por <i>H. seropedicae</i> SmR1	29
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA.....	30
4.5 CONSTRUÇÕES DAS BIBLIOTECAS DE TRANSCRIPTOMA E SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA	30
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (ESTs) DE RAÍZES DE ARROZ 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM <i>H. seropedicae</i>	34
5.1.1 Genes encontrados exclusivamente na biblioteca de raízes inoculadas.....	36
5.1.2 Genes encontrados preferencialmente na biblioteca de raízes não inoculadas.....	41
5.2 COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ NIPPONBARE POR <i>H. seropedicae</i>	43
5.3 EXTRAÇÃO DE RNA E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE TRANSCRIPTOMA.....	48
5.4 MAPEAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA AS BIBLIOTECAS DE RNA-seq APÓS 3 DIAS DA INOCULAÇÃO.....	50
5.5 MAPEAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA AS BIBLIOTECAS DE RNA-seq APÓS 7 DIAS DA INOCULAÇÃO.....	56
5.6 ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIAMENTE EXPRESSOS DAS PLÂNTULAS DE ARROZ 3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO.....	58
5.6.1 Metabólitos secundários.....	60
5.6.2 Metabolismo de metal.....	67
5.6.3 Metabolismo de fito-hormônios.....	71

5.6.4 Genes relacionados ao estresse.....	78
5.7 ANÁLISE DE GENES DE <i>H. seropedicae</i> EXPRESSOS NAS BIBLIOTECAS DE RAÍZES DE ARROZ INOCULADAS.....	88
6 CONCLUSÕES.....	92
7 REFERÊNCIAS.....	94
8 ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

O arroz, trigo e milho constituem as principais culturas de alimentos do mundo. Juntos fornecem mais de 50% de todas as calorias consumidas pela população humana. A produção anual mundial do arroz é cerca de 465 milhões de toneladas e o seu consumo pela população humana é responsável por 21% da energia diária *per capita* (Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz – IRRI, 2013). Portanto, o arroz é um alimento de grande importância e o crescimento populacional implica em um aumento na produção de arroz para atender a demanda global por arroz.

O arroz e outros cereais necessitam de um manejo adequado de nutrientes no solo para alcançar alta produtividade (BURESH, 2010). Depois da água o nutriente de maior importância para a planta é o nitrogênio, isto explica o elevado uso de fertilizantes nitrogenados na cultura do arroz e de outros cereais (LADHA; REDDY, 2003). Para aumentar a produção de arroz são aplicados no solo grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. Em 2010, o Brasil utilizou 2,8 milhões de toneladas de fertilizantes em suas culturas (*Food and Agriculture Organization of United Nations* (FAOSTAT)). Entretanto, o consumo excessivo de fertilizantes, além de possuírem um alto custo de produção, pode acarretar danos ao meio ambiente como contaminação de lençóis freáticos.

Bactérias fixadoras de nitrogênio constituem uma importante alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados. Um exemplo é a bactéria endofítica diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* que estabelece interação com várias espécies vegetais tais como arroz e cana-de-açúcar, e cuja capacidade de transferir nitrogênio fixado para as plantas tem sido descrita (BALDANI V.L.D; BALDANI J.I.; DÖBEREINER, 2000; CANUTO *et al.*, 2003). Assim, a produção de arroz poderia ser beneficiada com a inoculação de estirpes de *H. seropedicae* capazes de transferir nitrogênio fixado para a planta. Todavia, os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* ainda não estão esclarecidos. O presente trabalho tem como principal objetivo contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de colonização de *Oryza sativa* L. (japonica) por *H. seropedicae* através da identificação de genes envolvidos nessa interação. Os resultados poderão ser importantes para trabalhos que visam melhorar a eficiência na interação de *H. seropedicae* com arroz e outras gramíneas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E SEUS BENEFÍCIOS

Depois da água, o nitrogênio é o principal fator limitante do desenvolvimento das plantas. As plantas podem obter nitrogênio do solo nas formas de amônio e nitrato. Consequentemente, a capacidade das plantas de absorver N do solo é determinante no rendimento das culturas de arroz. Devido a isso, a produtividade da cultura do arroz é amplamente dependente da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Esta aplicação de fertilizantes nitrogenados é feita mais de uma vez na plantação e as perdas de nitrogênio correspondem a aproximadamente 50% do total aplicado (HOLZSCHUH *et al.*, 2009). A fertilização além de ser uma prática economicamente dispendiosa, agride o meio ambiente.

A maior fonte de N está no ar atmosférico e seu uso poderia minimizar o uso de fertilizantes químicos. Isto é possível devido à capacidade de uma pequena parcela de microrganismos procarióticos (denominados diazotróficos) de converter dinitrogênio atmosférico gasoso para amônio. Este processo é denominado fixação biológica de nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase, e seu produto é o amônio, forma de nitrogênio metabolicamente assimilável pelas plantas (SIMPSON; BURRIS, 1984; POSTGATE, 1982). A reação catalisada pela nitrogenase é a seguinte:



Em *H. seropedicae* a fixação biológica de nitrogênio é altamente regulada em ambos os níveis, transcricional e pós-traducional. A expressão de nitrogenase depende da disponibilidade de amônio no meio externo e da concentração de oxigênio, que é um inibidor potente da nitrogenase (revisada por CHUBATSU *et al.*, 2012).

Os benefícios da fixação biológica de nitrogênio são descritos em plantas de arroz, onde a inoculação com diazotrofos mostrou aumento no conteúdo de nitrogênio (BALDANI *et al.*, 2000; JAMES *et al.*, 2002; GYANESHWAR *et al.*, 2002). Os diazotrofos *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* podem aumentar o conteúdo de nitrogênio das folhas e a produção de cana-de-açúcar significativamente, mas não podem substituir completamente o uso de fertilizantes químicos

(MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999). Todavia, a inoculação simultânea de vários diazotrofos, como mostra Oliveira *et al.* (2002), pode contribuir ainda mais para o aumento do conteúdo de nitrogênio da planta.

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio de 6 linhagens de *H. seropedicae* pré-selecionadas foi avaliada em plantas de arroz em condições de cultivo axênicas (gnotobióticas). A contribuição relativa da fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi observada com uso de ^{15}N marcado. A maior contribuição foi de 54% para a estirpe Z94, mas na média a contribuição foi de 34% do nitrogênio total acumulado na planta. No entanto quando as plantas foram cultivadas no solo a contribuição da FBN para o acúmulo de N na planta caiu pela metade do observado *in vitro*. A maior contribuição de N nessa condição foi de 20% com *Burkholderia brasiliensis* estirpe M130, seguida de *H. seropedicae* estirpe Z67 (19%) e Z94 (17%) (BALDANI *et al.*, 2000).

Canuto *et al.* (2003) ao comparar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio por *H. seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar cultivada em casa de vegetação mostrou que os melhores resultados de fixação biológica de nitrogênio foram de *H. seropedicae*, sendo as raízes o local preferencial para colonização e estabelecimento destas duas espécies. Em cana-de-açúcar, além de *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* também é encontrado colonizando raízes, caules e folhas (REIS *et al.*, 2000).

Estudos da população de endofíticos em arroz mostraram que nem todos são diazotróficos. Barraquio *et al.* (1997) analisaram 25 genótipos de arroz (incluindo arroz selvagem e arroz de diferentes ambientes como alagado ou sequeiro) e encontraram que mais que 50% da população bacteriana era constituída de bactérias endofíticas diazotróficas e nos outros 21 genótipos esta fração foi menor que 10%.

2.2 *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae SmR1 é uma bactéria gram-negativa da classe Betaproteobacteria. A estirpe, SmR1 utilizada neste trabalho, é um mutante espontâneo da estirpe Z78 resistente a estreptomicina, e teve seu genoma sequenciado e anotado (PEDROSA *et al.*, 2011). O genoma da estirpe SmR1 consiste em um cromossomo único e circular de 5.513.887 pares de bases com

63,4% de conteúdo GC e 4.735 ORFs que codificam 3.108 proteínas com função atribuída (PEDROSA *et al.*, 2011).

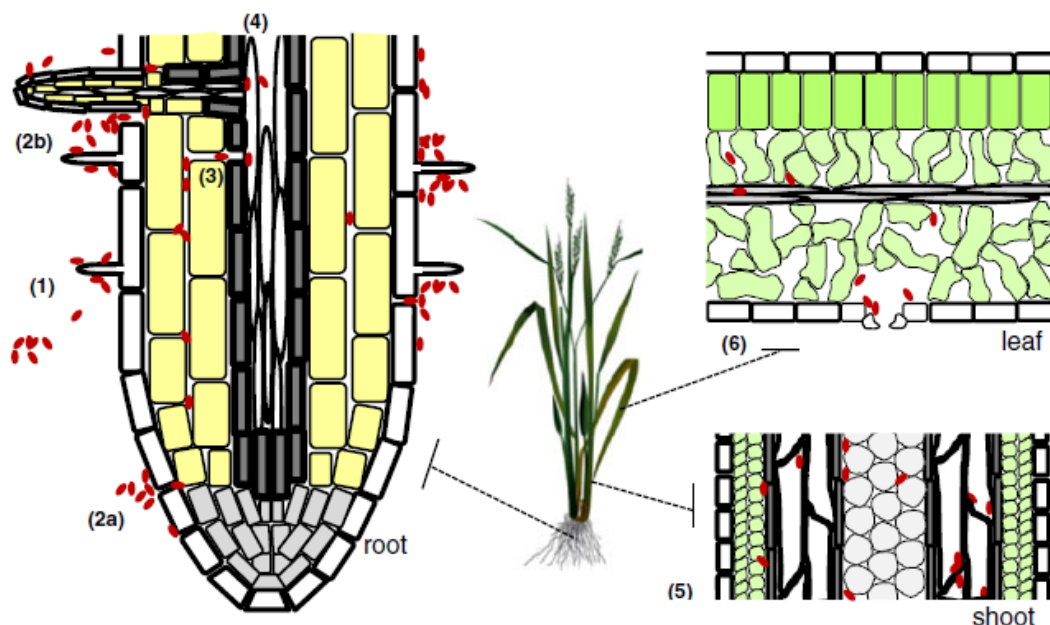
H. seropedicae é capaz de colonizar endofiticamente uma grande variedade de plantas principalmente da família Poaceae, como por exemplo, arroz, milho e cana-de-açúcar e sua inoculação em plantas não causa doenças (BALDANI *et al.*, 1996; BALDANI V.L.D; BALDANI J.I; DOBEREINER, 1986; OLIVARES *et al.* 1996; PIMENTEL *et al.*, 1991; JAMES *et al.*, 2002). Esta associação com plantas pode ocorrer na superfície da raiz (epifítica) e no interior da planta (endofítica) (GYANESHWAR *et al.*, 2002; OLIVARES *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 2002).

A colonização epitífica e endofítica em plantas de milho por mutantes de *H. seropedicae* com síntese de lipopolissacarídeos alterada foi significativamente reduzida, sugerindo que lipopolissacarídeos podem estar envolvidos na colonização bacteriana (BALSANELLI *et al.*, 2010). Além disso, mutantes para o gene da muropeptídeo permease também mostraram alteração no perfil de lipopolissacarídeos da membrana de *H. seropedicae*. Esta mutação causou redução da colonização endofítica após 1 e 3 dias da inoculação e nenhuma alteração na adesão inicial em plantas de milho. Este gene pode estar envolvido na estabilização da interação com o hospedeiro vegetal (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011).

A penetração de *H. seropedicae* nas raízes de plantas de arroz ocorre através de fendas nos pontos de emergência de raízes laterais. Posteriormente, o microrganismo coloniza espaços intercelulares, aerênquima, tecido vascular, como xilema, e alcança tecidos aéreos da planta, sendo frequentemente encontrado em caules e folhas (FIGURA1) (OLIVARES *et al.*, 1997; OLIVARES, JAMES, 2000; JAMES *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). A estirpe B501 de *Herbaspirillum* spp. coloniza arroz selvagem (*Oryza officinalis*) sendo encontrada no espaço intercelular mas não nos vasos xilemáticos. Interessantemente, a população endofítica dessa estirpe é maior na espécie de arroz selvagem do que nas cultivares analisadas (ELBELTAGY *et al.*, 2001).

A inoculação de *H. seropedicae* em plantas contribui para a promoção do crescimento de raízes e brotos de arroz e cana-de-açúcar, bem como, aumenta a taxa de germinação de sementes de arroz (ARANGARASAN; PALANIAPPAN; CHELLIAH, 1998; PEREIRA *et al.*, 1988; BALDANI *et al.*, 2000; GYANESHWAR *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2002; BODDEY *et al.*, 1995). Essa contribuição para a

promoção do crescimento se deve em parte a capacidade de *H. seropedicae* fixar N atmosférico e fornecê-lo para a planta.



A colonização de plantas por *H. seropedicae* (representado por bacilos vermelhos) inicia por quimiotaxia e adesão na superfície da raiz principalmente na zona de emergência de raízes laterais e pelos radiculares (1). A maioria das células bacterianas permanece na superfície da raiz, mas parte dessas células penetra nas raízes através de regiões com descontinuidade da epiderme como a zona de alongamento (2a) e em pontos de emergência de raízes laterais (2b). Posteriormente ocupa espaços intercelulares (3) e vasos xilemáticos (4). Parte dessas bactérias colonizam partes aéreas como folhas (6) e caule (5).

FIGURA 1: COLONIZAÇÃO DE PLANTAS POR *H. seropedicae*

FONTE: MONTEIRO *et al.* 2012

A capacidade de *H. seropedicae* fixar nitrogênio *in planta* foi demonstrada através da detecção de β -glucuronidase expressa a partir do promotor *nifH* e imunodetecção com anticorpo contra NifH (JAMES *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). A fixação de nitrogênio deve ser favorecida no interior da planta, pois proporciona condições propícias para expressão dos genes *nif* (de fixação de nitrogênio) tais como concentração de oxigênio baixa e disponibilidade de nutrientes (SOUZA *et al.*, 1999). Entretanto, plantas de arroz inoculadas com estirpes de *H. seropedicae* que fixam (Nif^+) e que não fixam (Nif^-) nitrogênio, não apresentaram diferença de peso seco 30 dias após a inoculação (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Este resultado sugere que não é somente a fixação biológica de nitrogênio que contribui para a promoção do crescimento da planta. A produção de outros componentes tais como fito-hormônios pode estar contribuindo

para a promoção do crescimento vegetal. *H. seropedicae* Z67 e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, por exemplo, são capazes de produzir ácido indol-3-acético (AIA) (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993; BASTIAN *et al.*, 1998). Em concordância com esses dados, o genoma de *H. seropedicae* SmR1 possui 4 vias possíveis para a síntese de auxina (PEDROSA *et al.*, 2011).

2.3 A RESPOSTA DA PLANTA A INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

A interação entre planta e bactéria pode ocorrer de três formas: simbiótica, patogênica e associativa (PUHLER *et al.*, 2004). Entre estas, a interação mais estudada é entre planta e patógeno. Neste sistema a planta detecta a invasão do patógeno e utiliza um sistema de defesa que inclui: 1) morte celular programada (conhecida como resposta hipersensitiva [HR]), 2) reforço estrutural no sítio de infecção que pode progredir para o estabelecimento de um sistema imune secundário (chamado de resistência sistêmica adquirida [SAR]), 3) produção de proteínas e metabólitos antimicrobianos, 4) indução da expressão de genes relacionados à defesa que inclui um sistema de reconhecimento da invasão (Revisado por McDOWELL; SIMON, 2008; ABRAMOVITCH; ANDERSON; MARTIN, 2006).

Estudos de interação planta-patógeno mostraram que a ativação do sistema de defesa da planta é dependente do reconhecimento de sinais moleculares por receptores da planta. Estes sinais moleculares gerados no sítio de infecção resultam na ativação/repressão de fatores de transcrição que reconhecem sequências específicas da região promotora do DNA de genes relacionados à defesa (McDOWELL; DANGL, 2000).

Alguns cultivares de cana-de-açúcar, como a B-4362, desenvolvem a patologia estria mosqueada ao serem inoculadas com *H. rubrisubalbicans* (OLIVARES *et al.*, 1997). A inoculação de *H. seropedicae* em tal variedade, bem como na variedade SP 70-1143, resistente à doença estria mosqueada, induziu uma resposta hipersensitiva em ambas. Entretanto, os sintomas não evoluíram e as plantas não desenvolveram a estria mosqueada (OLIVARES *et al.*, 1997). Estes resultados indicam que *H. seropedicae* não atua como um fitopatógeno, estabelecendo uma interação planta-bactéria que pode trazer vantagens para ambas as espécies.

A interação associativa planta-bactéria pode induzir a resistência a doenças. A inoculação de arroz com *Azospirillum* sp. B510 induziu a resistência a doenças causadas por *Magnaporthe oryzae* e por *Xanthomonas oryzae*. Esta resistência teria sido adquirida sem a produção de substâncias antimicrobianas, mas com a ativação do sistema imunológico inato da planta (YASUDA *et al.*, 2009). Esses resultados estão de acordo com os resultados de Rocha *et al.* (2007) que observou a indução de genes de resistência em cana-de-açúcar após inoculação com duas espécies de *Herbaspirillum* spp., *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

Estudos da expressão gênica durante interação associativa planta-bactéria tem contribuído para a identificação de componentes moleculares envolvidos nesse processo. As primeiras análises utilizaram fragmentos de seqüências expressas (ESTs) para detectar genes diferencialmente expressos em uma determinada condição. Em cana-de-açúcar, por exemplo, foram identificados diversos genes expressos somente na presença de bactérias endofíticas diazotróficas *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans* (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Nesse estudo a expressão de genes relacionados a defesa em cana-de-açúcar é modulada pela inoculação com *G. diazotrophicus* ou *H. rubrisubalbicans*. Além disso, diferentes genes foram induzidos ou reprimidos para cada bactéria sugerindo que a resposta do hospedeiro a inoculação e controle da colonização são distintos dependendo da espécie bacteriana. Muitas destas ESTs foram identificadas como proteínas receptoras do tipo quinase, receptores de hormônios, fatores de transcrição, resposta a estresse entre outros (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Entre estes genes destacam-se os relacionados à via de sinalização de etileno e auxina.

Etileno é um fito-hormônio que afeta diversos processos no desenvolvimento da planta, como nodulação/crescimento de raízes e resposta a ataque de patógenos (HOFFMAN *et al.*, 1999; MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012). Níveis elevados de auxina podem levar a um aumento na biossíntese de etileno (YANG; HOFFMAN, 1984 citado por BLEECKER; KENDE, 2000; MORGAN, HALL, 1962). Em contrapartida etileno pode regular positivamente a biossíntese de auxina (SWARUP *et al.*, 2007; RUZICKA *et al.*, 2007). Etileno e auxina agem sinergicamente no alongamento de raízes e formação de pelos radiculares e antagonisticamente na formação de raízes laterais (MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012). Como micro-organismos podem produzir auxina (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993; BASTIAN *et*

al., 1998), estes poderiam estar utilizando as vias de auxina para promover o crescimento raízes.

A expressão gênica de um provável receptor de etileno (SCER1) e de dois prováveis fatores de transcrição de resposta a etileno (SCERF1 e SCERF2) de cana-de-açúcar mostrou que a modulação desses genes é dependente da espécie de diazotrofo e do tempo de inoculação. Além disso, a expressão desses genes é alterada quando o inoculante é um fitopatógeno. Como por exemplo, SCER1 tem sua expressão induzida por endofítico diazotrófico, mas é reprimida quando a planta é inoculada com patógeno. O padrão de expressão diferencial desses genes sugere que podem fazer parte de uma via dependente de etileno que modula a resposta de cana-de-açúcar para a inoculação com bactéria diazotrófica, discriminando interação patogênica de não patogênica (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

A participação de genes de resposta a etileno também foi observada em estudos de transcritos da interação entre cana-de-açúcar, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e o patógeno *Xanthomonas albilineans*. A maioria dos transcritos diferencialmente expressos (26%) está envolvida na via de sinalização de etileno seguido por proteínas reguladas por auxina (9%) (ARENCIBIA *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que para cada genótipo de planta são obtidas respostas diferentes para um mesmo diazotrofo. *H. seropedicae*, por exemplo, apresenta um maior grau de colonização no cultivar de arroz IR72 do que IR42 (JAMES *et al.*, 2002). Gyaneshwar *et al.* (2002) também observaram diferenças entre cultivares ao inocular *H. seropedicae* Z67 em variedades de arroz tolerantes e sensíveis a alta concentração de alumínio. As variedades tolerantes inoculadas apresentaram maior atividade de nitrogenase, conteúdo total de N e carbono do que as variedades sensíveis. Estes resultados indicam que o grau de colonização é dependente do genótipo da planta. Os benefícios observados nas plantas são também altamente variáveis, sendo afetados não só pelo genótipo da planta, mas também pelo meio ambiente (ROGER; LADHA, 1992; MALARVIZHI; LADHA, 1999; SHRESTHA; LADHA, 1996; CHOUDHURY; KENNEDY, 2004).

Diferentes estratégias são utilizadas para estudar a interação entre bactérias associativas e plantas. Uma das estratégias utilizadas é a análise da expressão diferencial para identificar genes envolvidos em tais associações. Isto pode ser alcançado através do seqüenciamento em larga escala das seqüências expressas (RNA-seq).

2.4 TRANSCRIPTOMA POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNA-seq)

Transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de uma célula em um estágio de desenvolvimento ou condição biológica específica (NOBUTA; VEMARAJU; MEYERS, 2007). Conhecer o transcriptoma de um organismo ou tecido é essencial para entender como o genoma é expresso e como o metabolismo funciona na condição estudada.

Para estudar o transcriptoma de um organismo o método que tem sido utilizado atualmente é a nova geração de seqüenciamento de DNA, denominada RNA-seq. O mRNA é utilizado para a síntese de cDNA, que é então seqüenciado em equipamento de altíssima produtividade. Esta nova tecnologia possui algumas vantagens em relação ao método de microarranjo, que é uma técnica também utilizada para estudar expressão gênica. A principal vantagem de RNA-seq é a capacidade de seqüenciar uma grande proporção de transcritos presentes em uma amostra, incluindo os de baixa expressão, e não somente aqueles que são depositados no microarranjo (CHEN *et al.*, 2007). Outra vantagem é a de não necessitar de conhecimento prévio da seqüência, como no caso de microarranjo onde se utiliza seqüências conhecidas para mensurar a expressão gênica. Além disso, permite a diferenciação de polimorfismo de um nucleotídeo (SNP) o que não é possível diferenciar no microarranjo (CHEN *et al.*, 2007). Entretanto, o genoma de referência é de extrema importância para estudos de transcriptoma porque permite que seja feita a identificação dos genes que estão sendo expressos em uma dada condição.

Zhang e colaboradores (2010) compararam seus dados de RNA-seq de arroz com os de microarranjo de Li *et al.* (2007) e observaram que mais de 60% das regiões transcritas obtidas por microarranjo estavam presentes nos dados de RNA-seq. Por outro lado, mais de 72% dos transcritos de RNA-seq não foram mensuradas pelo método de microarranjo. Além disso, obteve-se 7.232 genes conhecidos que não haviam sido analisados por microarranjo.

A análise de transcriptoma permite detectar quais tipos de transcritos estão sendo expressos, incluindo RNA mensageiro (mRNA), variantes alternativos (derivado do processo de *splicing* alternativo), RNA não codificador e pequenos RNAs (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

2.5 TRANSCRIPTOMA DO ARROZ

Com o objetivo de produzir um conjunto de mRNA total expresso na planta de arroz, 22 bibliotecas de cDNA de diversos tecidos como caule, folhas e flores foram produzidas (NOBUTA *et al.*, 2007). Estas bibliotecas foram construídas utilizando tecnologia de seqüenciamento denominada MPSS (do inglês *Massively Parallel Signature Sequencing*) que permite seqüenciar milhões de pequenos fragmentos de mRNA de 17 pares de bases (pb). Entre as 68.409 leituras de seqüências que alinharam uma única vez no genoma, 20.821 encontram-se em regiões gênicas e 13.461 em regiões intergênicas. As regiões intergênicas podem se tratar de genes não anotados ou novos genes e RNAs não codificadores, incluindo pequenos RNAs (NOBUTA *et al.*, 2007). Entre os genes anotados no genoma do arroz, 84% foram confirmados experimentalmente pelos dados de MPSS de Nobuta *et al.* (2007) e por seqüências de cDNA disponíveis em bancos de dados.

Estudo de RNA-seq em arroz permitiu a análise da mudança do perfil transcricional em diferentes estágios de desenvolvimento e a identificação de genes induzidos pelo estresse salino e pela interação com patógenos (XU *et al.*, 2012; MIZUNO *et al.*, 2010; KAWAHARA *et al.*, 2012). Ao comparar o perfil de expressão por RNA-seq em arroz em interações compatíveis (onde o hospedeiro é suscetível) com interações incompatíveis (hospedeiro é resistente) foi observado um maior número de genes diferencialmente expressos em interações incompatíveis. Entre os genes de arroz induzidos pela presença do patógeno *Magnaporthe oryzae* os autores destacam os que degradam componentes da membrana do patógeno como glucanas e chitinases além de inibidores de proteases que inibem o crescimento do patógeno. Além disso, genes relacionados a defesa também são induzidos como de peroxidases, de proteínas da família WRKY (que participam da regulação de genes de defesa) e fitoalexinas (KAWAHARA *et al.*, 2012).

Esses estudos permitem o entendimento dos fatores moleculares envolvidos em condição específicas que servirão como base para estudos mais aprofundados. Esses e outros resultados de RNA-seq indicam uma complexidade do transcriptoma eucariótico maior do que o esperado, permitindo a identificação de transcritos e eventos de *splicing* alternativo, acarretando um aumento no número de novos transcritos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Entre os novos transcritos de arroz identificados por Zhang e colaboradores (2010), 1133 foram oriundos de

regiões de elementos transponíveis (TE), que representa uma atividade substancial de TE em arroz. Além disso, o genoma de arroz e sua anotação foram recentemente atualizados utilizando dados de sequenciamento de nova geração. Nesse estudo, um total de 4.886 erros de sequenciamento foram identificados e corrigidos em 321 Mb (KAWAHARA *et al.*, 2013).

Uma vez que a análise de transcriptoma permite a identificação de genes expressos em uma condição específica o principal objetivo desse trabalho foi identificar genes de arroz envolvidos na interação com *H. seropedicae*. Assim, foram analisadas sequências de EST anteriormente produzidas e as sequências produzidas por RNA-seq de raízes de arroz inoculadas e não inoculadas com *H. seropedicae*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Herbaspirillum seropedicae coloniza arroz e promove o seu crescimento. Os mecanismos envolvidos nessa interação benéfica entre *H. seropedicae* e plantas de arroz não são bem compreendidos e fatores moleculares envolvidos permanecem desconhecidos. Para compreender melhor essa interação, o principal objetivo deste trabalho é realizar análise do transcriptoma de raízes de arroz (*Oryza sativa* L.) inoculadas e não inoculadas com *H. seropedicae*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar dados de sequências expressas (ESTs) gerados durante o mestrado. Após tratamento e análise das sequências, identificar os genes diferencialmente expressos através da frequência de genes em cada condição;
- Confirmar a expressão de genes selecionados das bibliotecas de ESTs através da técnica de RT-qPCR;
- Estabelecer condições para cultivo de arroz cv. Nipponbare em condições gnotobióticas e de inoculação com *H. seropedicae* SmR1;
- Determinar o perfil de colonização do arroz cv. Nipponbare por *H. seropedicae*;
- Extrair RNA total de raízes de arroz inoculado e não inoculado com *H. seropedicae* SmR1;
- Seqüenciar RNA total de arroz inoculado e não inoculado com SmR1 utilizando a Plataforma de Sequenciamento SOLiD4;
- Alinhar as seqüências obtidas com o genoma de arroz e identificar genes diferencialmente expressos;

4 METODOLOGIA

4.1 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (ESTs) DE ARROZ 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae*

As sequências, obtidas no mestrado de Brusamarello (2007) e Pacheco (2008), primeiramente passaram por um filtro de qualidade através do programa PHRED (EWING *et al.* 1998; EWING; GREEN, 1998). Este filtro consistiu na remoção de sequências do vetor e remoção de sequências com comprimento menor que 75pb e com escore Phred menor que 15. As sequências que passaram por esses critérios foram alinhadas, através do programa Cap3 (Huang and Madan 1999), em contigs. Sequências que não alinharam (chamadas de *singlets*) e sequências que alinharam (chamadas de *contigs*) foram comparadas com banco de nucleotídeos de arroz (RAP-DB) e banco NCBI utilizando o programa BLASTn (Altschul *et al.* 1997). O número de sequências obtidas é independente do tamanho das bibliotecas.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO mRNA POR RT-qPCR

A análise das bibliotecas de ESTs de raízes de arroz 7 dias após a inoculação com *H. seropedicae* resultou na identificação de genes candidatos a genes diferencialmente expressos. Estes genes tiveram sua expressão quantificada através da transcrição reversa do RNA em DNA, seguida da amplificação quantitativa deste (RT-qPCR). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada a partir de amostras de RNA total de raiz de arroz inoculado e não inoculado 7 dias após inoculação com *H. seropedicae*. Foram utilizados duas cultivares de arroz Cateto Zebu e Nipponbare. Após a extração de RNA, através do kit RNAqueous (Life Technologies), o RNA total foi tratado com DNaseI (Ambion, código do produto: AM1906) para remoção de possível contaminação com DNA genômico. Posteriormente, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit “high-capacity cDNA reverse transcription” (Applied Biosystems – Life Technologies). Todas as etapas foram realizadas conforme orientação do fabricante.

As amostras de cDNA, foram diluídas 25 vezes em água tratada com DEPC antes da amplificação utilizando kit “Power SYBR-Green PCR Master Mix” e mantidas a -20°C. O gene com expressão constitutiva utilizado para normalizar a quantificação relativa codifica a proteína actina (JAIN *et al.*, 2006b). Os

oligonucleotídeos iniciadores (*primers*, TABELA 1) foram planejados com auxílio do programa *Primer Express 3.0* (*Life Technologies*) e tiveram sua eficiência determinada através de uma curva de eficiência. O equipamento utilizado para a detecção da amplificação foi “Step One Plus Real Time-PCR System” da empresa *Life Technologies*. A expressão gênica relativa (RQ) foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INCIADORES (*PRIMERS*) PARA QUANTIFICAÇÃO POR PCR QUANTITATIVA (RT-qPCR)

Nome do EST	Produto do gene/descrição	Número de acesso do Banco RAPDB	Sequência dos oligonucleotídeos		R ²	Eficiência
			Forward	Reversa		
Tipo IAA11	Similar a IAA11	Os05g0559400	5'GAGCTGCCAAGGCACAAGTT3'	5'CTGGCGGCCAATGTATTCTT3'	0,949	2,08
Tipo IAA18	Similar a proteína responsiva a auxina IAA18	Os02g0228900	5'CCCTGTAGCTGGTGGTGGAT3'	5'TGCAGGCAAGGCAAACTAAA3'	0,875	2,93
Tipo ARF2	Similar a fator de resposta a auxina 2	Os01g0927600	5'GGCCTGAATCAAGTTGGAGATC3'	5'CTATCTGGCCGCGGAATAGTT3'	0,983	2,06
Tipo ERF2	Similar a fator de resposta a etileno 2	Os07g0617000	5'CCGCAAGGGTAGAGATGGT3'	5'TCAACATCGAAATCCCAAGAACT3'	0,988	2,11
Tipo ERF3	Similar a fator de ligação a elemento responsivo a etileno 3	Os03g0182800	5'TGCAGCAGCCTATGCAGATC3'	5'CGCGAGGACACTGCTTGAT3'	0,994	1,99
Tionina	Proteína da família de tioninas	Os06g0513862	5'GCTGAGGAATCGGAGGTAGTTG3'	5'TTCTCATGGTGCTGCACACA3'	0,994	1,89
Osthi1	Tionina Osthi1	Os06g0513781	5'GGAGGTAGTTGACTTCTGCAAGCT3'	5'ATTGCCAAAAAGAGTGCTCATG3'	0,972	1,90
ISAP1	Proteína responsiva a estresse múltiplo com dedo de zinco ISAP1	Os09g0486500	5'GCAATCCTCATCACACAGCAA3'	5'CCCTCTTGGTCTCAGGCTCTCT3'	0,997	1,98
104,7PBZ1	Proteína induzida por probenazol (PBZ1)	Os12g0555100	5'GGCACCGTTGTCATTCTGAA3'	5'GTGCCACCACACGTGTCTTG3'	0,97	1,99
Metalotioneína	Proteína tipo metalotioneína 1	Os11g0704500	5'CAAAGTCTCCTGCGGAAAG3'	5'ACGACGGTGGCCTTGGT3'	0,988	2,05
ACT-11	Actin a11	AK100267	5'CAGCCACACTGTCCCCATCTA3'	5'AGCAAGGTCGAGACGAAGGA3'	0,994	2,0
β-TUB	β-tubulina	AK072502	5'GCTGACCACACTAGCTTTGG3'	5'AGGGAACCTTAGGCAGCATGT3'	0,981	2,09

R² corresponde ao coeficiente da curva obtida utilizando os valores de CT (*threshold cycle*) das amostras de cDNA diluídas. A linearidade da reação foi de 3 ordens de grandeza. A eficiência (E) foi determinada através da seguinte fórmula, $E=10^{(-1/\text{coeficiente angular})}$, onde eficiência com o valor de 2 corresponde a 100%.

FONTE: A autora (2013)

4.3 CULTIVO E INOCULAÇÃO DE *Oryza sativa*

4.3.1 *Oryza sativa* e *Herbaspirillum seropedicae*

Neste trabalho foram utilizadas sementes de *Oryza sativa* L. *japonica* cultivar Nipponbare, gentilmente cedida pelo Instituto Riograndense de Arroz (IRGA). Esta cultivar teve seu genoma sequenciado (GOFF *et al.*, 2002; IRGSP, 2005) e é a mais utilizada em estudos genômicos de arroz (HERVÉ; KAYANO, 2006).

Para inoculação do arroz foi utilizada a bactéria *H. seropedicae* estirpe SmR1 que é um mutante espontâneo da estirpe Z78 com resistência ao antibiótico estreptomicina [$80 \mu\text{g.mL}^{-1}$] (BALDANI *et al.*, 1986). *H. seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio e promover o crescimento do arroz (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003)

4.3.2 Desinfecção superficial das sementes

Primeiramente foi feita uma seleção das sementes de Nipponbare que apresentaram aspecto saudável e sem manchas escuras. O tegumento foi retirado e as sementes foram imersas em solução de etanol 70% por 4 minutos, seguida por incubação a vácuo em solução de hipoclorito de sódio 8% (v/v) contendo Triton X-100 0,1% por 30 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas 15 vezes com água destilada estéril e incubadas 14-15 horas em solução contendo 0,025% do fungicida Vitavax-Thiram (Chentura). As sementes foram então lavadas três vezes com água destilada estéril e transferidas para placas contendo ágar-água 0,7%. Para avaliar o aparecimento de contaminantes e favorecer o processo de germinação, as sementes foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Após este período, e na ausência de evidência de contaminantes, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo solução nutriente de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950 modificado, composição em Anexo 1).

Para verificar a eficiência do processo de desinfecção superficial, após o período de 48 horas de incubação em meio agar-água, 100 mg de sementes aparentemente não contaminadas foram maceradas em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e o macerado foi diluído seriadamente (10^{-1} a 10^{-4}). Dez microlitros de cada diluição foi plaqueado em meio NFbHPN-Malato sólido e as placas incubadas a 30°C por 24 - 48 horas.

4.3.3 Cultura de *Herbaspirillum seropedicae* para inoculação das plântulas de arroz

H. seropedicae SmR1 foi cultivado em meio NFbHPN-malato (MACHADO *et al.*, 1991, modificado, Anexo 1) líquido com estreptomicina 80 µg/mL para inoculação nas plântulas de *O. sativa* L. cv. Nipponbare. Usualmente *H. seropedicae* era riscado em placas contendo ágar NFbHPN-Malato e várias colônias eram re-inoculadas em 5 mL de NFbHPN-Malato líquido com estreptomicina 80 µg/mL e incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm por 12-16 horas. A cultura era então re-inoculada em meio fresco, novamente incubada até atingir densidade ótica (D.O.) em 600 nm de 0,8-1, que corresponde a 10^8 células por mL. As células foram então centrifugadas a 20.300 g por 10 segundos, lavadas com meio NFbHPN-Malato, ressuspensas no mesmo meio (D.O.600nm =1,0; 10^8 células/mL) e utilizadas para inoculação das plântulas.

4.3.4 Condições de cultivo das plantas de arroz

Após 3 dias da desinfecção superficial das sementes de arroz, as plântulas foram submetidas a dois tratamentos:

- a) Tratamento inoculado (IR): neste tratamento as plântulas foram inoculadas por 30 minutos com suspensão de *H. seropedicae* SmR1 (10^8 células/ mL) (1 plântula por mL de cultura);
- b) Tratamento não inoculado (CR): o mesmo procedimento foi realizado, neste as plântulas foram tratadas apenas com meio NFbHPN-malato estéril.

Após incubação as plântulas foram lavadas com solução Hoagland estéril e transferidas para tubos de ensaio contendo 25 mL da mesma solução e mantidas por mais 3 dias (amostras nomeadas IR3 e CR3) e 7 dias (amostras nomeadas IR7 e CR7) (FIGURA 2). Para a cultura hidropônica foi utilizado 25 mL de solução de Hoagland (HOAGLAND; ARNON 1950, modificado) e 5,75 g de esferas de polipropileno para sustentação da planta em tubo de vidro com dimensões de 25 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro (FIGURA 3). Esse sistema foi mantido em câmara de cultivo a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas e umidade superior a 80%. Para determinar a presença de contaminantes, 100 mg de plântulas foram maceradas em 1 mL de solução salina, diluídas (10^{-1} a 10^{-4}), plaqueadas em meio NFbHPN-Malato sólido e incubadas a 30°C por 24-48 horas. Após inoculação indicada (3 a 7 dias

após inoculação) as raízes foram então coletadas e acondicionadas a -70 °C com o reagente protetor de RNA (*RNAlater- Ambion, Life Technologies*).

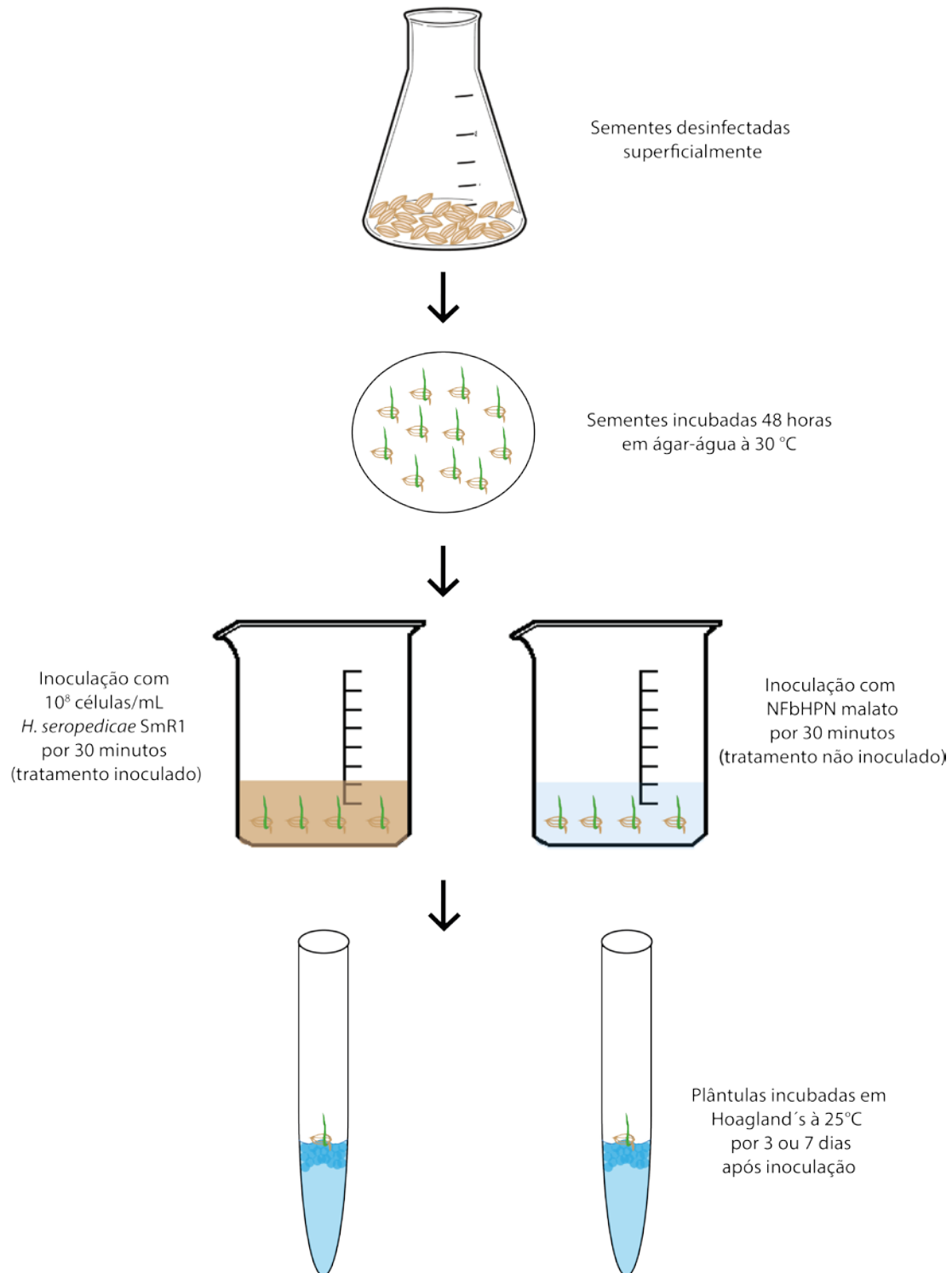


FIGURA 2- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO CULTIVO DE *Oryza sativa* E INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae* SmR1

FONTE: A autora (2013)



A figura mostra à esquerda plantas não inoculadas (C) e à direita plantas inoculadas (I) com *H. seropedicae* SmR1.

FIGURA 3 – SISTEMA DE CULTIVO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE ARROZ EM TUBOS DE ENSAIO COM ESFERAS DE POLIPROPILENO

FONTE: A autora (2013)

4.3.5 Colonização de plântulas de arroz por *H. seropedicae* SmR1

A colonização da raiz por *H. seropedicae* foi monitorada através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de raiz. Para a contagem de células de SmR1 endofíticas foi feito um tratamento de desinfecção superficial das raízes. Para isso, aproximadamente 100mg de raízes foram primeiramente mantidas em etanol 70% por 1 minuto, cloramina T 1% por 1 minuto e em seguida lavadas três vezes com água destilada estéril (DOBEREINER *et al.*, 1995, modificado). Após esse processo, as raízes foram maceradas em 1mL de NFbHPN-malato. A partir deste macerado foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) e plaqueadas em NFbHPN-malato sólido contendo $80\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina. Após incubação à 30°C por 24-48 horas foi feita a contagem de células. Para a contagem de células que ficaram aderidas na superfície, as raízes foram pesadas, lavadas com solução salina e imersas em 1mL de solução salina. Em seguida, o tubo foi agitado em vortex por 1 minuto para o desprendimento das células das raízes. A suspensão de bactérias foi diluída e o número de células

determinado como acima. O monitoramento do número de células da bactéria que colonizaram as plântulas de arroz foi realizado 1, 3 e 7 dias após inoculação.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total de raízes de arroz foi purificado com o kit “RNAqueous” (Life Technologies) para as plântulas de 3 dias e com o método do Trizol (Sigma) para as plântulas de 7 dias. Em seguida as amostras de RNA total foram tratadas com 2µL de DNase I (Ambion, 2U/µL) e incubadas em estufa 37°C por 30 min. A DNase I foi inativada com a adição de 0,2 volume de solução inativante (DNase Inactivation Reagent, Life Technologies) e essa mistura foi deixada a temperatura ambiente por 2 minutos, sendo homogeneizada duas vezes neste período. Na sequência as amostras foram centrifugadas a 13400rpm (Mini Spin, Eppendorf) por 60 segundos para decantar a solução inativante e o sobrenadante transferido para um novo tubo. As amostras foram precipitadas com LiCl (kit *RNAqueous*), lavadas com etanol 75%, secas e dissolvidas em água MilliQ tratada com DEPC.

Para a construção das bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma (RNA-seq), o RNA ribossomal foi parcialmente eliminado utilizando o kit “RiboMinus Plant kit for RNA-Seq” (Life Technologies) partindo de 7µg (IR3, CR3) ou 10µg (IR7, CR7) de RNA total. Todos os procedimentos para essas duas etapas foram realizados conforme recomendações do fabricante.

4.5 CONSTRUÇÕES DAS BIBLIOTECAS DE TRANSCRIPTOMA E SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA

As bibliotecas de transcriptoma foram construídas a partir de 500 ng de RNA depletado de RNA ribossomal utilizando o kit *SOLiD Total RNA-seq* (Life Technologies). Os cDNAs foram sequenciados através do método de ligação seqüencial de oligonucleotídeos marcados e detecção utilizando plataforma de sequenciamento SOLiD (*Sequencing by Oligo Ligation and Detection*) utilizando o kit de sequenciamento de fragmentos de 50 pb (*SOLiD Fragment Library Sequencing kit 50*). Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme instruções do fabricante (Life Technologies). O RNA foi extraído de duas amostras independentes de cada tratamento, resultando em 8 amostras de RNA processadas independentemente. Para cada amostra foi utilizado um código de identificação

(*barcode*) que permite diferenciar as amostras após o sequenciamento em conjunto (TABELA 2).

TABELA 2 – CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO UTILIZADO PARA O SEQUENCIAMENTO DE CADA AMOSTRA

Amostra	Código de Identificação (<i>barcode</i>)
CR3a	9
CR3b	10
IR3a	11
IR3b	12
CR7a	1
CR7b	2
IR7a	3
IR7b	4

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As novas plataformas de sequenciamento em larga escala de DNA são baseadas em sequenciamento paralelo maciço permitindo a obtenção de mais de 600 Gigabases em uma única corrida, utilizando plataforma HiSeq (ILLUMINA, 2013). Quando as seqüências são obtidas a partir do mRNA, que é primeiramente transformado em cDNA, o método é chamado de RNA-seq e tem sido largamente utilizado para quantificar os níveis globais de expressão gênica. As seqüências produzidas neste trabalho possuem um comprimento de 50 pares de bases (pb). Após obtenção dos dados brutos em código de cores (*color space*) as seqüências foram processadas para aumentar sua qualidade. Para isso foi utilizado o programa SAET (Life Technologies) que aplica um algoritmo para identificar bases que foram perdidas na análise inicial do equipamento. Isto é possível porque no método de sequenciamento por ligação cada base é lida duas vezes, diminuindo a perda de seqüências obtidas. Em seguida um filtro de qualidade foi utilizado através do *software* “CLC Genomics Workbench”. Este filtro selecionou leituras de seqüência com *escore* de qualidade maior que 0,05 (probabilidade de erro <5%) e descartou leituras com tamanho menor que 20 pb. Em seguida, as seqüências foram

mapeadas no genoma de arroz com o programa “CLC Genomics Workbench” utilizando arquivos contendo o genoma de *Oryza sativa* cv. Nipponbare anotado pelo Projeto de Anotação do Genoma de Arroz (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Os parâmetros de mapeamento utilizados foram: alinhamento mínimo de 95%, identidade mínima de 90% e o alinhamento em somente uma única posição do genoma. A FIGURA 4 mostra o fluxograma de análise das sequências.

A análise dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando um conjunto de genes com um mínimo de sequências que cobrem o tamanho do gene. Este valor de cobertura foi calculado utilizando o número de sequências alinhadas no gene, o tamanho médio das sequências e o tamanho do gene com a fórmula abaixo.

$$\text{Cobertura} = \frac{\text{número de sequências alinhadas no gene A} \times \text{tamanho médio das sequências}}{\text{Tamanho do gene A}}$$

O conjunto de genes com pelo menos duas vezes de cobertura foram submetidos à análise da expressão diferencial através do programa DESeq (ANDERS, HUBER 2010), utilizando a ferramenta RobiNA (<http://mapman.gabipd.org/web/quest/robin>; LOHSE *et al.*, 2012) que disponibiliza esse programa em uma versão Java de fácil execução. Este programa utiliza método estatístico baseado na distribuição binomial negativa e no teste de Benjamini-Hochberg (1995) que gera um p-ajustado levando em consideração testes de hipóteses múltiplas (ANDERS, HUBER 2010).

Foram considerados diferencialmente expressos, entre as condições “raízes inoculadas” e “raízes não inoculadas”, os transcritos com valores de expressão diferentes com confiança de 95% ($p < 0,05$). Além disso, foram separados aqueles com maior ou menor diferença de expressão, ou seja, com variação de expressão ≥ 2 ou ≤ 2 .

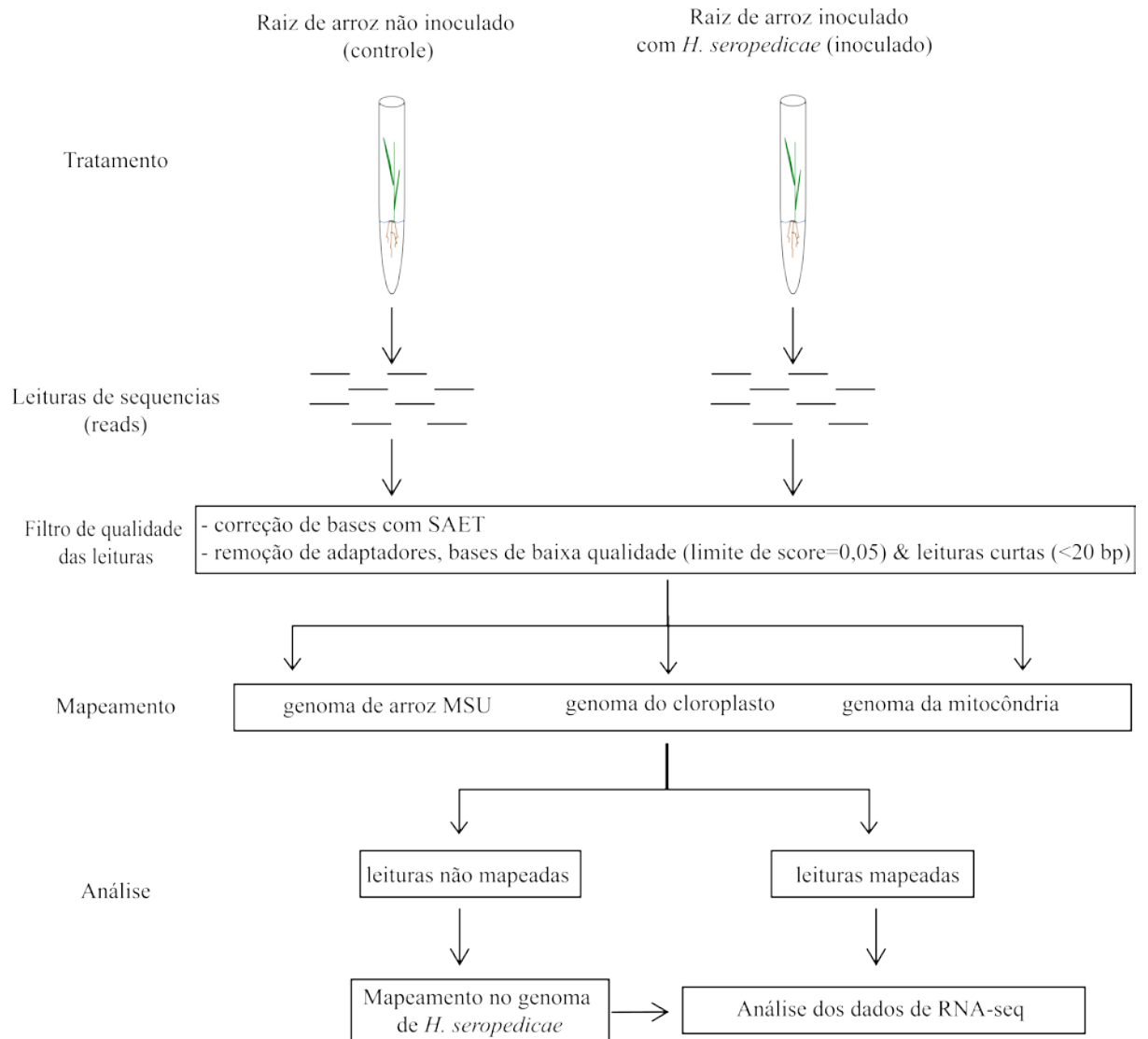


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

FONTE: A autora (2013)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS (ESTs) DE RAÍZES DE ARROZ 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae*

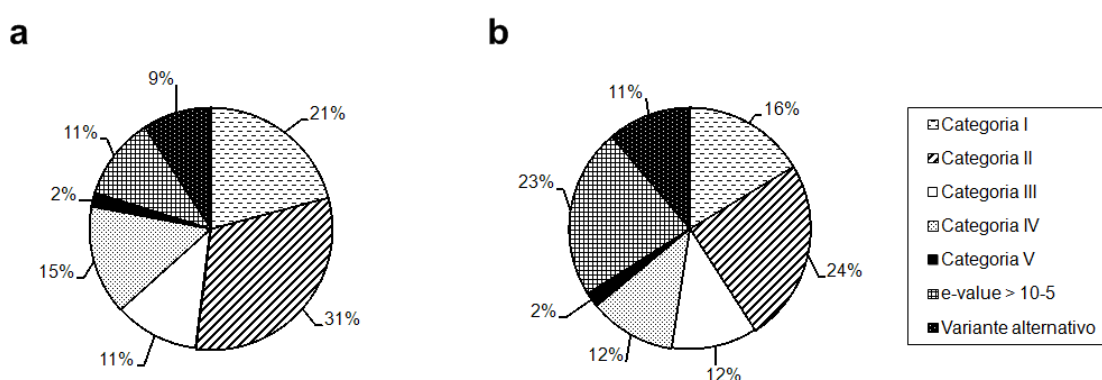
Entender o mecanismo de interação entre plantas e microrganismos promotores do crescimento pode contribuir para o melhoramento dessas interações. Para identificar novos genes envolvidos nessa interação, bibliotecas de cDNA de raízes de arroz inoculadas (RRCH) e não inoculadas (RRSH) com *H. seropedicae* foram construídas utilizando metodologia tradicional de clonagem, e parte dos clones obtidos foram sequenciados (BRUSAMARELLO, 2007). Posteriormente PACHECO (2008) completou o sequenciamento dos clones obtidos, totalizando 3.684 sequências da biblioteca de cDNA de raízes de arroz cv. Cateto Zebu colonizada por *H. seropedicae* e 1.920 clones para as bibliotecas de raízes não colonizadas.

Para identificar transcritos de genes envolvidos com a interação *H. seropedicae*-arroz, as sequências obtidas por Brusamarello (2007) e Pacheco (2008) foram reunidas e re-analisadas. Inicialmente, as leituras de sequências de baixa qualidade (<Phred 15) foram removidas e as sequências foram montadas utilizando o programa Cap3 (HUANG; MADAN, 1999). As leituras de bibliotecas de raízes não inoculadas (RRSH) produziram 1256 sequências únicas ou *singlets* (com média de 235 pb) e 72 contigs (média de 334 pb) que juntas totalizam 1327 ESTs. Já para as bibliotecas de raízes inoculadas com *H. seropedicae* (RRCH) foram obtidas 716 sequências únicas (média de 263 pb) e 59 contigs (média de 393 pb), totalizando 775 ESTs. Somente sequências com escore mínimo de qualidade Phred 15 e com pelo menos 75 pb foram selecionadas. Essas sequências foram depositadas no banco de nucleotídeos do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) com os seguintes números de acesso dbEST JG457553–JG459237.

O conjunto de EST obtido foi comparado com o banco do genoma do arroz (RAP-DB, ITOH, *et al.* 2007) e NCBI (BENSON, *et al.* 2008). Setenta e cinco por cento e 88% das ESTs das bibliotecas RRCH e RRS, respectivamente, correspondem a regiões previamente descritas em arroz (*e-value* menor que 10^{-5}). Os ESTs restantes com *e-value* maior que 10^{-5} foram alinhados com o genoma de arroz e a maioria (63,2% e 70% para RRS e RRCH, respectivamente) alinhou a regiões vizinhas a genes anotados, sugerindo que eles também resultaram de

sequências expressas. Sequências com baixo escore de alinhamento ($E\text{-value} > 10^{-5}$) e aquelas que alinharam na região vizinha a genes anotados foram removidos das análises posteriores, resultado em 1002 e 686 ESTs para RRCH e RRSB, respectivamente. A distribuição de ESTs entre os cromossomos mostrou que os cromossomos 1, 2 e 3 possuem as maiores densidades de EST, contendo 39% do total de ESTs, um resultado similar ao obtido por Wu *et al.* (2002).

Em seguida, os produtos de tradução das ESTs foram classificados funcionalmente de acordo com as categorias do banco RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) (FIGURA 5).



Categoria I, proteínas conhecidas; Categoria II, sequências $\geq 50\%$ de identidade com proteínas de banco de dados cuja função foi confirmada experimentalmente; Categoria III, sequências contendo motivos confirmados; Categoria IV, proteínas hipotéticas conservadas, Categoria V, proteína hipotética. a, RRSB biblioteca não inoculada; b, RRCH, biblioteca inoculada com *H. seropedicae*.

FIGURA 5 – CLASSIFICAÇÃO DAS ESTs DE ACORDO COM O CRITÉRIO DO BANCO RAP-DB
FONTE: A autora (2013)

Para identificar ESTs candidatos a genes diferencialmente expressos entre as duas condições, as sequências das categorias I a III foram comparadas e aquelas que apareceram em maior número em uma das bibliotecas foram identificadas e analisadas (TABELA 3). Além disto, foram selecionados alguns genes para quantificação de níveis relativos de mRNA por RT-qPCR.

TABELA 3 – ESTs CANDIDATAS A DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM RAÍZES COLONIZADAS POR *H. seropedicae*

Proteínas codificadas pelos ESTs	ESTs in RRCH (775 total)	ESTs in RRSB (1327 total)
Proteína da família citocromo P450	0	5
Proteína contendo repetições ricas em leucina	0	9
Proteína contendo domínio N-terminal, de choque térmico DnaJ	0	4
Proteína de choque térmico 70	0	1
Similar a proteína de choque térmico 82	0	1
Proteína tipo Metalotioneína	25	12
Proteína responsiva ao estresse contendo dedo de zinco ISAP1 (Proteína associada ao estresse 1)	4	0
Similar a proteína integral de membrana tipo NOD26, ZmNIP2-1	6	3
Similar ao precursor da cadeia gama Orizaina	6	1
Similar a proteína induzida por probenazol PBZ1	8	4
Proteína da família das tioninas	5	2
Proteína contendo domínio tipo WD40	2	4
Proteína da família de resistência a doenças	6	3
Sequências relacionadas as vias de etileno		
Similar ao fator de resposta a etileno 2	0	2
Similar ao elemento fator 3 de ligação responsivo a etileno (OsERF3)	0	1
Similar a metionina sintetase responsiva a etileno	0	1
Similar a RNA helicase responsiva a etileno	0	1
Similar a protein 1 tipo ETO1(proteína tipo etileno super produzido 1)	0	1
Similar a proteína ER66	0	1
Sequências relacionadas as vias de auxina		
Similar ao fator de resposta a auxina 1	0	1
Similar ao fator de resposta a auxina 2 (proteína de ligação a ARF1)	1	0
Similar a proteína IAA18 de resposta a auxina (proteína 18 induzida por ácido indol acético)	0	1
Similar a IAA11	0	2

RRCH, biblioteca inoculada com *H. seropedicae*, RRSB, biblioteca não inoculada.

FONTE: A autora (2013).

5.1.1 Genes encontrados exclusivamente na biblioteca de raízes inoculadas

Os seguintes genes foram encontrados apenas na biblioteca inoculada com *H. seropedicae*: proteína da família citocromo P450 (5 sequências), proteína contendo domínio N-terminal rico em repetições de leucina (9 sequências), proteínas de choque térmico (6 sequências) e proteínas envolvidas nas vias de sinalização por etileno (7 sequências) e auxina (4 sequências) (TABELA 3).

O grupo de genes com maior número de ESTs exclusivo de raízes inoculadas codificam quinases tipo receptor rica em repetições de leucina (LRR). Estas proteínas parecem estar envolvidas na regulação da resposta a uma variedade de sinais de estresses ambientais (HONG *et al.*, 1997) e patógenos (GÓMEZ-GÓMEZ; BOLLER, 2000). Vinagre *et al.* (2006) isolaram de cana-de-açúcar um cDNA que codifica uma possível quinase tipo receptora (RLK) SHR5 diferencialmente regulado pela presença de bactérias endofíticas. Os níveis de mRNA de SHR5 diminuíram em cana-de-açúcar inoculada com *H. seropedicae*, mas não foram alterados quando as plantas foram inoculadas com bactéria patogênica

(VINAGRE *et al.*, 2006). Os autores sugerem que este gene está relacionado com a mediação da associação entre cana-de-açúcar e bactéria endofítica.

Uma vez que *H. seropedicae* contém o sistema de secreção tipo III (T3SS) em seu genoma (PEDROSA *et al.*, 2011), e efetores do tipo T3SS estão envolvidos com interações planta-bactéria (DEAKIN; BROUGHTON, 2009), a presença de ESTs que codificam proteínas com sítio de ligação a nucleotídeo e com regiões rica em repetições de leucina (NBS-LRR) nas bibliotecas inoculadas pode ser resultado da injeção de proteínas na célula vegetal via T3SS.

O segundo grupo de genes expressos exclusivamente nas bibliotecas inoculadas codifica proteínas da família P450. Esta família está envolvida em diversos processos em plantas e sua expressão pode ser modulada em resposta a diversos sinais. Takemoto *et al.* (1999) analisaram o padrão de expressão de um gene que codifica o citocromo P450 (CYP82E1), proteína relacionada a reposta de defesa em tabaco, e concluíram que poderia estar envolvido com a resistência a doença agindo em cooperação com o produto do gene EAS (5-epi-aristoloceno sintase) para limitar a proliferação de patógenos. Mesmo que *H. seropedicae* não seja um patógeno de arroz, o controle do número de células bacterianas no tecido hospedeiro é provavelmente essencial para a manutenção de uma interação benéfica e harmoniosa (GYANESHWAR *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2002).

ESTs que codificam membros da família de proteínas DnaJ também foram detectadas nas bibliotecas de raízes inoculadas. Estas proteínas estão envolvidas na defesa da planta contra vírus e estresse abiótico (LU *et al.*, 2009; HOFIUS *et al.*, 2007). Nestas bibliotecas também foram detectados diversos ESTs relacionados ao metabolismo de fito-hormônios, especialmente etileno e ácido indol acético (AIA). Embora genes de resposta a etileno sejam importantes para a planta em diversas condições, estes foram encontrados apenas nas bibliotecas inoculadas, o que pode ser devido a importância de modular a via de etileno durante a interação arroz-*H. seropedicae* ou um viés resultante do pequeno tamanho das bibliotecas e a baixa expressão desses genes.

Modulação de hormônios de planta é uma estratégia utilizada por ambos os organismos patogênicos e não patogênicos para colonizar a planta (VERHAGE; WEES; PIETERSE, 2010). Etileno é um hormônio de planta, gasoso, que influencia diversos processos como crescimento da planta e desenvolvimento, senescência das folhas e flores, nodulação de raízes por bactérias diazotróficas simbióticas,

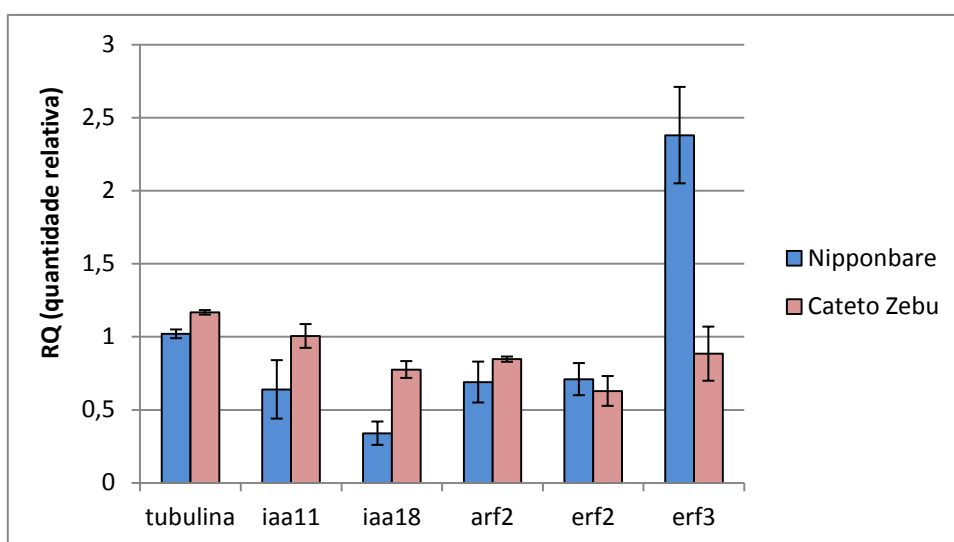
morte celular programada e resposta a estresse e ataque por patógenos (BLEECKER; KENDE, 2000). Estudos com mutantes de soja mostraram que redução da sensibilidade a etileno aumenta a resistência contra ataque de alguns patógenos mas diminui contra ataque de outros patógenos (HOFFMAN *et al.*, 1999).

Os primeiros componentes da via de sinalização por etileno são receptores de etileno, os quais regulam a resposta de defesa da planta (CIARDI *et al.*, 2000). Em arroz a família de genes de receptores de etileno possui 5 membros: ERL1 (também chamado de ETR2), ETR3, ETR4, ERS1 e ERS2. Entretanto seu mecanismo de sinalização permanece desconhecido. Fatores de resposta a etileno são fatores de transcrição envolvidos em muitos processos, incluindo a regulação da interação entre planta e hospedeiro (GUTTERSON; REUBER, 2004).

Cavalcante *et al.* (2007) investigaram o padrão de expressão de um possível receptor de etileno (ScER1) e dois possíveis fatores de transcrição de resposta a etileno (ScERF1 e ScERF2) de cana-de-açúcar em resposta a associação com bactérias diazotróficas. ScERF2 é um homólogo do gene de arroz chamado EREBP-3 (Os01t0313300), enquanto ScERF1 é homólogo a EREBP-5 (Os06t0194000), mas estes dois genes não foram identificados nas bibliotecas de arroz. Em cana-de-açúcar a expressão de ScERF2 é induzida após inoculação com as bactérias promotoras do crescimento *G. diazotrophicus* ou *Herbaspirillum* spp, e não é induzida na presença de bactérias patogênicas como *Leifsonia xyli*. O oposto foi observado para ScERF1 (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Estes autores propõem que as proteínas codificadas pelos genes SCER1, SCERF1, e SCERF2 podem ser parte de uma via de sinalização de etileno que modula a resposta de cana-de-açúcar a bactéria endofítica, discriminando a interação entre patogênico e não patogênico. Em concordância com essa hipótese, estudo de cana-de-açúcar inoculada com *G. diazotrophicus* e o patógeno *Xanthomonas albilineans* revelaram que a maioria dos transcritos diferencialmente expressos (TDFs) (26%) correspondem a via de sinalização de etileno, incluindo 2 receptores e 10 fatores de transcrição (ARENCIBIA *et al.*, 2006)

Na biblioteca de EST de raízes inoculadas foram identificados genes envolvidos na via de etileno: uma EST que codifica RNA helicase responsiva a etileno e 4 fatores de transcrição de resposta a etileno (ERFs), incluindo 2 ESTs que codificam proteína tipo ERF2, tipo ERF3 e ER66.

Em *Arabidopsis* a RNA helicase responsiva a etileno ER68 parece estar envolvida na regulação da expressão gênica mediada por etileno, mas o mecanismo de seu envolvimento não está esclarecido (LINDER; OWTTRIM, 2009). As ESTs que codificam proteínas tipo ERF2 (Os070617000, codifica proteína tipo fator de resposta a etileno 2) e ERF3 (Os03g0182800, codifica proteína similar ao elemento fator 3 de ligação resposivo a etileno) foram escolhidas para determinar a expressão gênica por PCR quantitativa (RT-qPCR). Os resultados da RT-qPCR indicaram que o gene tipo ERF2 está reprimido 1,4 e 1,6 vezes nas cultivares Nipponbare e Cateto Zebu, respectivamente, 7 dias após a inoculação com *H. seropedicae* SmR1. Enquanto que o gene tipo ERF3 está induzido 2,4 vezes no cv. Nipponbare e não está regulado no cv. Cateto Zebu (RQ=0,88) (FIGURA 6).



A análise de expressão por RT-qPCR foi feita com RNA total extraído de raízes de arroz 7 dias após inoculação com *H. seropedicae*. O gráfico mostra os níveis de mRNAs em raízes inoculadas em relação aos de raízes não inoculadas. Estes genes foram selecionados entre aqueles que só foram identificados em bibliotecas de EST de raízes inoculadas com *H. seropedicae* (BRUSAMARELLO, 2007). Foram analisadas duas cultivares de arroz: Cateto Zebu e a cultivar Nipponbare. O gene constitutivamente expresso, utilizado como normalizador, codifica actina e foi expresso igualmente em ambas as condições analisadas. A expressão gênica relativa (RQ) foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

FIGURA 6 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES DE ARROZ UTILIZANDO RT-qPCR

FONTE: A autora (2013)

Poucos genes relacionados à via de auxina foram detectados nas bibliotecas de raízes inoculadas. O fito-hormônio auxina regula uma variedade de processos fisiológicos incluindo a emergência de raízes laterais, diferenciação do tecido vascular entre outras funções (ROGG; BARTEL, 2001). A ligação de fatores de resposta a auxina (ARFs) a elementos de resposta a auxina (AuxREs) controla a expressão gênica dependente de auxina. Esta regulação é mediada por proteínas membro da família Aux/IAA que inibem ARFs.

Os genes que codificam proteínas tipo ARF1, IAA18 e IAA11 foram detectados na biblioteca inoculada e ARF2 na biblioteca não inoculada. A análise da expressão desses genes por RT-qPCR mostrou que os genes IAA18 (AK121870; Os02t0228900; também chamada de IAA7 por JAIN *et al.* 2006a), IAA11 (AK109363; Os05t0559400; também chamada de IAA19 por JAIN *et al.* 2006a) e ARF2 (também chamada de ARF4 por WANG *et al.* 2007, AK072309; Os01t0927600) estão todos reprimidos em raízes de arroz inoculadas (FIGURA 6), com exceção do gene tipo IAA11 na cv. Cateto Zebu que não está regulado (RQ=1,01). Os valores de repressão são menos pronunciados no cultivar Cateto Zebu, quando comparado com a cv. Nipponbare, especialmente para o gene ARF2, o qual é fracamente reprimido na cv. Cateto Zebu. Estes genes codificam fatores de transcrição envolvidos com a sinalização e podem ser diferencialmente expressos em diferentes tecidos ou em resposta a intensidade da luz e/ou auxina (CHEONG, *et al.*, 2002; JAIN; KHURANA 2009).

Em coleóptilos de arroz 3 dias após tratamento com um análogo a auxina, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a expressão de IAA11 (no artigo chamado de IAA19) é induzida enquanto que o gene tipo IAA18 (chamado de IAA7) não é regulada (JAIN *et al.*, 2006a). Este resultado sugere que alterações na expressão gênica induzidas por *H. seropedicae* não é um resultado unicamente da produção da auxina pela bactéria.

É importante chamar a atenção para o fato de que neste trabalho as plantas utilizadas eram jovens. Portanto, é necessário realizar estudos com plantas em estágios mais avançados para determinar se a regulação desses genes está relacionada a estágios iniciais da interação planta-bactéria.

5.1.2 Genes encontrados preferencialmente na biblioteca de raízes não inoculadas

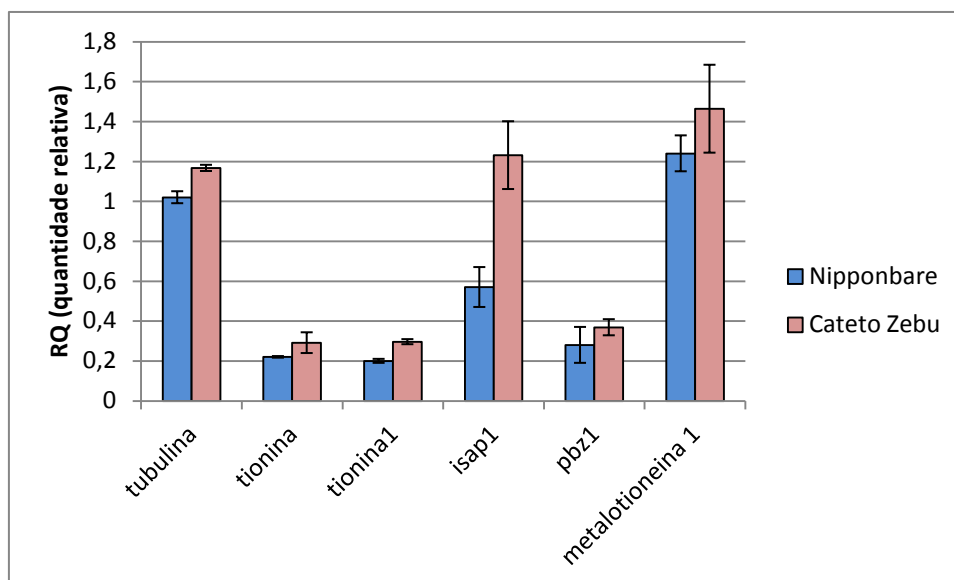
Os ESTs que são mais abundantes em raízes de arroz não inoculadas são candidatos potenciais a serem reprimidos pela presença da bactéria. Nas bibliotecas não inoculadas (RRSH) os seis ESTs mais abundantes codificam proteínas relacionadas ao estresse tais como, proteína tipo metalotioneína, proteína múltipla responsiva ao estresse com domínio dedo de zinco 1 (ISAP1), proteína integral a membrana tipo NOD26, precursor da cadeia gama da orizaína, proteína induzida por probenazol (PBZ1) e proteínas da família de tioninas.

A EST mais frequentemente encontrada (25 vezes na biblioteca RRSH e 12 vezes na RRCH) codifica proteína tipo metalotioneína (TABELA 3). Entre estas a EST que codifica proteína tipo metalotioneína 1 apresentou maior número de ESTs (17 vezes em RRSH e 9 vezes em RRCH). Este gene teve sua expressão mensurada por RT-qPCR e, ao contrário do esperado, foi fracamente induzido na presença da bactéria (1,46 vezes no cv. Cateto zebu e 1,24 no cv. Nipponbare, FIGURA 7). Metalotioneínas são proteínas de baixa massa molecular que ligam metais e estão provavelmente envolvidas com a manutenção dos níveis de metais em diversos organismos. Em arroz sua expressão é induzida em resposta a estresse abiótico como alta salinidade, estresse hídrico e estresse por metal pesado (JIN, *et al.* 2006), assim como sob infecção com o patógeno *Magnaporthe grisea* (KIM; AHN; LEE, 2001).

O gene ISAP1 que codifica proteína de resposta múltipla ao estresse foi detectada somente na biblioteca não inoculada (TABELA 3) e é regulado por diferentes estresses abióticos assim como por ácido abscísico (MUKHOPADHYAY; VIJ; TYAGI, 2004). Análise por RT-qPCR mostrou que este gene foi de fato reprimido 1,7 vezes na cv. Nipponbare e menos pronunciadamente (1,23 vezes) na cv. Cateto Zebu na presença de *H. seropedicae* (FIGURA 7).

Outro gene abundante na biblioteca não inoculada codifica proteína induzida por probenazol 1 (PBZ1) (8 sequências em RRSH e 4 em RRCH). O gene PBZ foi identificado originalmente por responder a aplicação de probenazol, um fungicida utilizado para o controle da doença brusone, e é capaz de levar a morte celular programada (KIM *et al.*, 2008). Este gene é reprimido em ambas as cultivares estudadas (reprimido 3,6 vezes na cv. Nipponbare e 2,7 na cv. Cateto Zebu, FIGURA 7).

Genes que codificam proteínas da família das tioninas também foram reprimidos pela presença de *H. seropedicae*. Análise por RT-qPCR mostrou repressão de 5 e 3,3 vezes, para as duas tioninas analisadas, nas cv. Nipponbare e Cateto Zebu, respectivamente (FIGURA 7).



A análise de expressão por RT-qPCR foi feita com RNA total extraído de raízes de arroz 7 dias após inoculação com *H. seropedicae*. O gráfico mostra os níveis de mRNAs em raízes inoculadas em relação aos de raízes não inoculadas. Estes genes foram selecionados entre aqueles que só foram identificados em bibliotecas de EST de raízes não inoculadas com *H. seropedicae* (BRUSAMARELLO, 2007). Foram analisadas duas cultivares de arroz: Cateto Zebu e a cultivar Nipponbare. O gene constitutivamente expresso, utilizado como normalizador, codifica actina e foi expresso igualmente em ambas as condições analisadas. A expressão gênica relativa (RQ) foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

FIGURA 7 – ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES DE ARROZ IDENTIFICADOS EM BIBLIOTECAS DE ARROZ NÃO COLONIZADOS POR *H. seropedicae* UTILIZANDO RT-qPCR

FONTE: A autora (2013)

Tioninas são proteínas que são tóxicas *in vitro* contra bactérias e fungos patógenos, sugerindo que estão envolvidas com sistemas de defesa da planta (FLORACK; STIEKEMA, 1994). Os genes identificados, que codificam tioninas, pertencem a grupo de tioninas altamente conservadas presentes no cromossomo 6 do genoma do arroz. As tioninas de arroz possuem diversos variantes que são expressas diferencialmente em diversos tecidos (STEC, 2006). Tioninas específicas de folha de plantas de cevada foram efetivas em diminuir o crescimento do fungo *Thievaliopsis paradoxa*, um patógeno de cana-de-açúcar, e *Drechslera teres*, um

patógeno de cevada. Além disso, após inoculação com esporos do fungo *Erysiphe graminis*, plantas de cevada responderam com um rápido aumento nos níveis de transcrição de tioninas específicas de folha (BOHLMANN *et al.*, 1988). Portanto, essas proteínas parecem participar de uma importante função na defesa contra patógenos. Estes resultados sugerem que estes genes podem estar sendo reprimidos por *H. seropedicae* para prevenir a resposta de defesa da planta. Outros genes envolvidos com a resistência a doença e outros estresses também foram detectados na biblioteca controle, enfatizando a importância da repressão desses genes para a interação arroz-*H. seropedicae*.

Bibliotecas de cDNA é o método de escolha para identificar genes envolvidos em um processo específico quando nenhum candidato é conhecido em sistemas similares ou quando os candidatos disponíveis não são suficientes para compreender o processo. Entretanto, o método tradicional de clonagem e sequenciamento é uma abordagem lenta e laboriosa, além disto, não é apropriada para determinar diferenças quantitativas na expressão gênica. Com advento de novas tecnologias de sequenciamento foi possível construir bibliotecas de RNA-seq e identificar genes de arroz diferencialmente expressos na presença de *H. seropedicae*. Com essa nova tecnologia é possível ainda inferir a variação da expressão gênica entre os tratamentos.

5.2 COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ NIPPONBARE POR *H. seropedicae*

A colonização das plântulas de arroz cv. Nipponbare por *H. seropedicae* SmR1 foi analisada pela determinação do número de bactérias no interior da planta (população endofítica) e superficialmente (população epifítica) (ver MATERIAL E MÉTODOS item 3.1.6). A população foi determinada 1, 3, e 7 dias após a inoculação das plântulas com *H. seropedicae* SmR1.

Os resultados obtidos mostram que a quantidade de bactérias colonizando a superfície do arroz é maior (média de $4,43 \times 10^8$ UFC/g de raiz) que no seu interior (média de $4,17 \times 10^5$ UFC/g de raiz) em todos os dias analisados (FIGURA 8). A população interna de *H. seropedicae* nos dias analisados se mantém em torno de 10^5 células/g de raiz (FIGURA 8). Esses dados sugerem que o número de células endofíticas de *H. seropedicae* é constante durante o crescimento da planta e está sob controle desta. A comunidade epifítica pode crescer provavelmente em

decorrência dos nutrientes secretados pela planta. Uma vez que o número de bactérias endofíticas e epifíticas por grama de peso fresco já estava praticamente estabilizado depois de 3 dias, os pontos de coleta das amostras, para construção das bibliotecas de RNA-seq, foram em 3 e 7 dias após a inoculação.

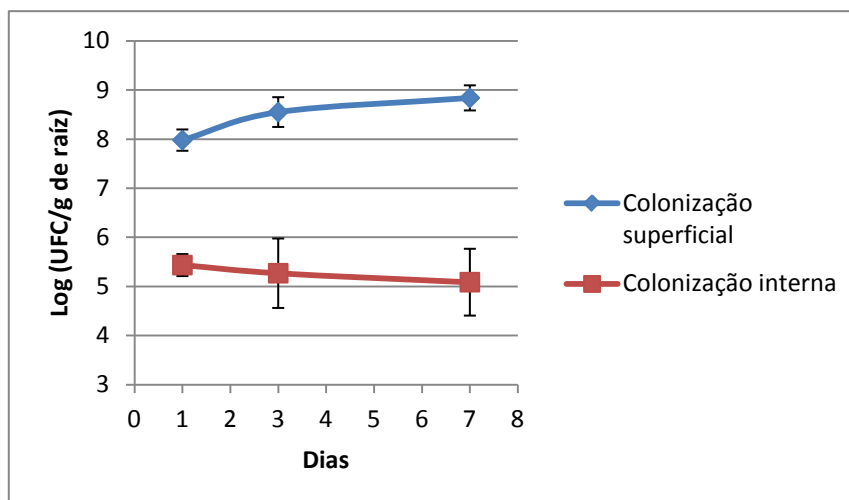


FIGURA 8 – NÚMERO DE CÉLULAS DE *H. seropedicae* EM TECIDO INTERNO E NA SUPERFÍCIE DE RAÍZES DE PLÂNTULA DE ARROZ

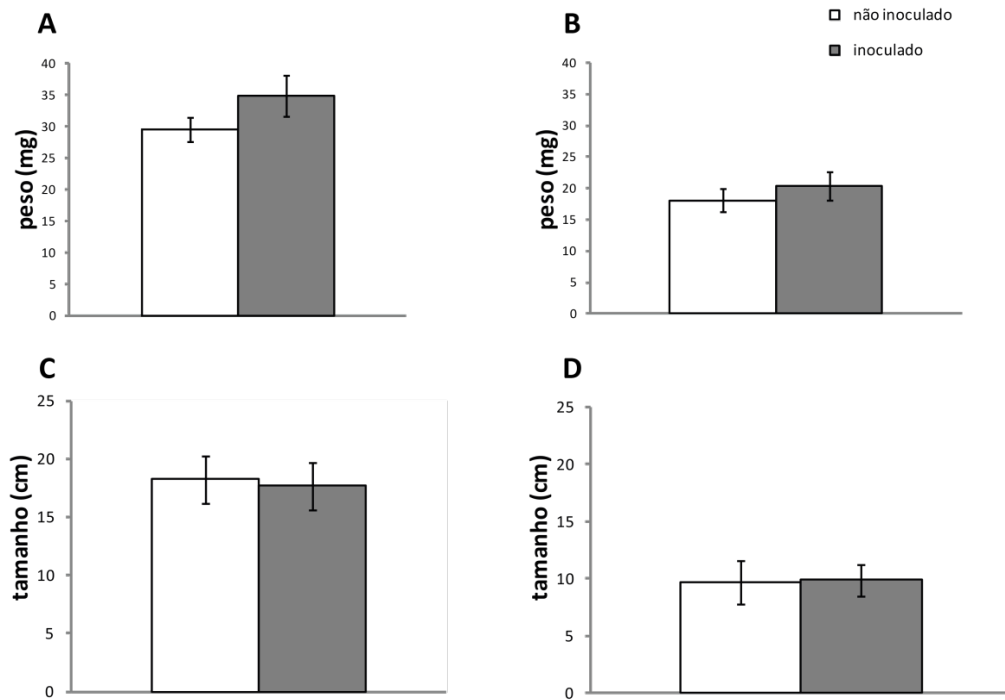
FONTE: A autora (2013)

Além da contagem de células foi avaliado o efeito da colonização no fenótipo da planta. Essa avaliação fenotípica consistiu em analisar a massa seca e o tamanho de folhas e raízes 14 dias após a inoculação. A parte aérea de plântulas de arroz apresentou uma massa seca média de 29,5 mg (não inoculado) e 34,9 mg (inoculado) (FIGURA 9A). A massa seca média das raízes não inoculadas foi de 18,05 mg e 20,4 mg da inoculada com *H. seropedicae* (FIGURA 9B).

O tamanho da parte aérea e das raízes foram mensurados pelo maior valor que cada parte alcança. As plântulas não inoculadas apresentaram uma média do tamanho da parte aérea de 18,2 cm e as plântulas inoculadas com bactérias 17,7 cm (FIGURA 9C). Para o tamanho das raízes (FIGURA 9D) neste mesmo período analisado foi obtido uma média de 9,7 (não inoculado) e 9,9 cm (inoculado).

Embora o peso seco e comprimento de raízes de plantas inoculadas tenham sido maiores que de plantas não inoculadas, entre os tratamentos não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Isto mostra que a inoculação com *H. seropedicae* não produziu efeito na variedade de arroz analisada. As FIGURAS 10 e 11 ilustram a

aparência fenotípica das plântulas nos tempos 3 e 7 dias após a inoculação com *H. seropedicae*, respectivamente.



O peso seco de folhas (A), raízes (B) e o tamanho das folhas (C) e raízes (D) foi determinado 14 dias após inoculação com *H. seropedicae* SmR1. Para esta análise foram utilizadas 4 repetições com 5 plantas para cada tratamento.

FIGURA 9 – AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DAS PLÂNTULAS DE ARROZ 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae* SmR1.

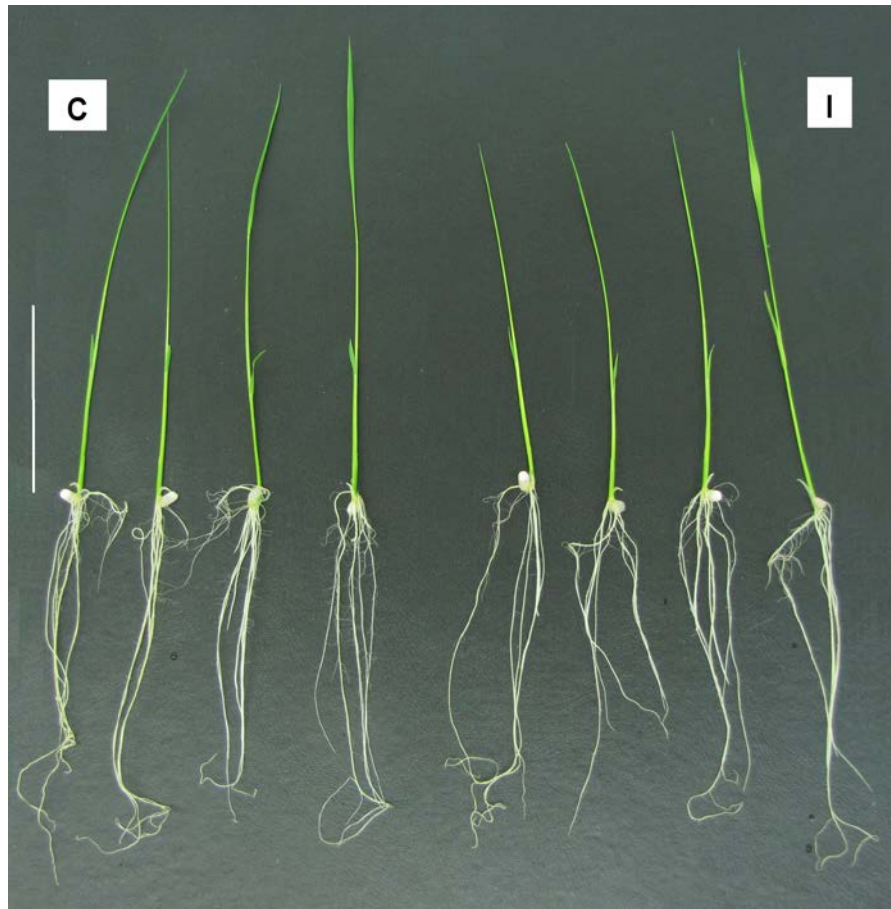
FONTE: A autora (2013)



A barra em branco representa 5 cm. À esquerda são plântulas não inoculadas (C) e à direita são plântulas inoculadas com *H. seropedicae* SmR1 (I).

FIGURA 10 – PLÂNTULAS DE *Oryza sativa* CV. NIPPONBARE 3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae* SmR1.

FONTE: A AUTORA (2013)



A barra em branco representa 5 cm. à esquerda são plântulas não inoculadas (C) e à direita são plântulas inoculadas com *H. seropedicae* SmR1 (I).

FIGURA 11 – PLÂNTULAS DE *Oryza sativa* cv. NIPPONBARE 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae* SmR1.

FONTE: A autora (2013)

5.3 EXTRAÇÃO DE RNA E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE TRANSCRIPTOMA

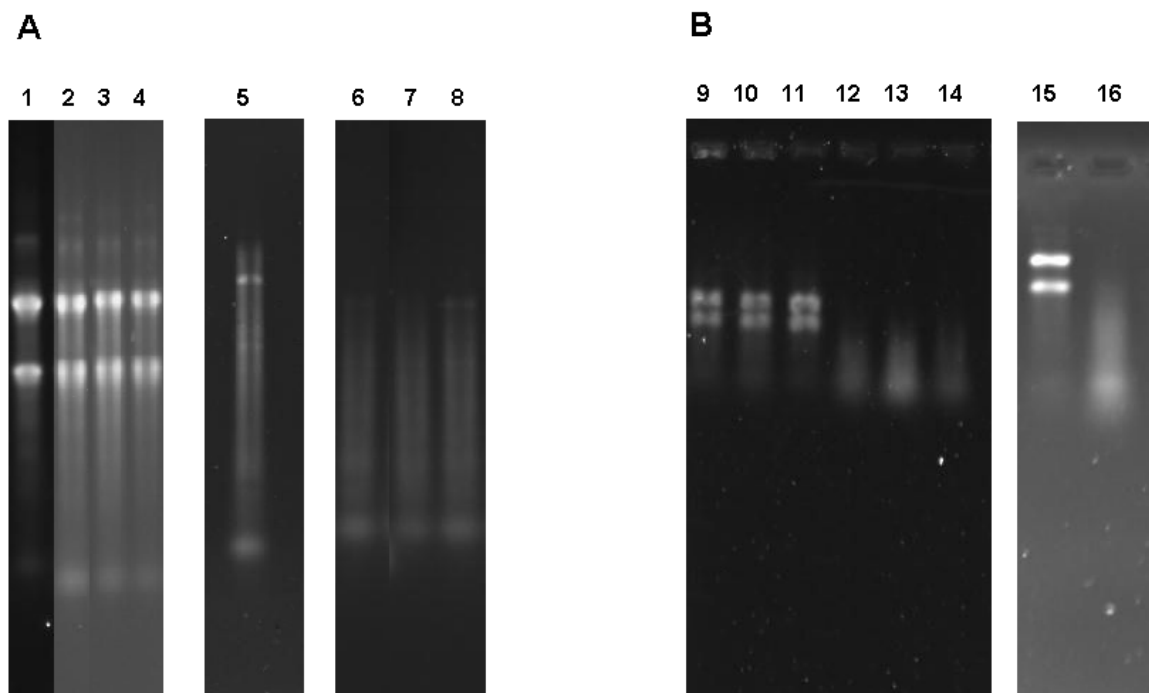
O RNA total foi extraído de raízes das plântulas de arroz 3 e 7 dias após inoculação. Para a extração de RNA das plântulas com 3 dias após a inoculação foi utilizado o kit RNAqueous (Ambion) e para os de 7 dias após inoculação foi utilizado o método do trizol. Esta diferença do método de extração foi em razão do rendimento da extração de RNA dependendo do tempo de cultivo da planta. As plantas com 7 dias após a inoculação (10 dias de cultivo) apresentaram um rendimento menor da quantidade de RNA total por mg de raiz com o kit RNAqueous. Portanto, optou-se pelo método do Trizol que apresentou maior rendimento de RNA total. Para cada tempo foram coletadas 2 amostras (**a** e **b**) coletadas de 10 plantas (3 dias) ou 8 plantas (7dias). A figura 12 ilustra o perfil eletroforético das amostras de RNA total e do RNA total depletado de RNA ribossomal (rRNA). As concentrações de RNA (total e depletado de rRNA) e cDNA obtidas estão na tabela 4.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DE RNA E cDNA OBTIDO PARA CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE TRANSCRIPTOMA

Amostra	Peso de raiz utilizado (mg)	RNA total (µg)	RNA utilizado para depleção (µg)	RNA total depletado (µg)	cDNA (ng)	Sequenciado (pg)
CR3a	188	9,0	7	0,674	168	5
CR3b	216	8,7	7	0,747	172	5
IR3a	147	13,0	7	0,798	282	5
IR3b	170	14,7	7	0,488	88	5
CR7a	798,8	53,1	10	1,2	2,08	5
CR7b	806,1	26,1	10	1,9	6,8	5
IR7a	846,7	85,2	10	1,1	14,16	5
IR7b	814,4	47,0	10	1,2	108,8	5

As amostras de raízes de arroz não inoculadas (C) e inoculadas (I) com *H. seropedicae* 3 e 7 dias após a inoculação tiveram seu RNA extraído em duplicata biológica (a e b). Dessa forma as amostras foram nomeadas de CR3a e CR3b (amostras não inoculadas, 3 dias após inoculação); IR3a e IR3b (amostras inoculadas, 3 dias após inoculação); CR7a e CR7b (amostras não inoculadas, 7 dias após a inoculação); IR7a e IR7b (amostras inoculadas, 7 dias após inoculação). O método de extração de RNA para as amostras de 3 dias foi o kit RNAqueous e para as de 7 dias foi o método do Trizol.

FONTE: A autora (2013)



A- RNA total extraído de raízes de arroz 3 dias após inoculação com *H. seropedicae* SmR1

- 1- RNA total da amostra IR3a
- 2- RNA total da amostra IR3b
- 3- RNA total da amostra CR3a
- 4- RNA total da amostra CR3b
- 5- RNA total depletado da amostra IR3a
- 6- RNA total depletado da amostra IR3b
- 7- RNA total depletado da amostra CR3a
- 8- RNA total depletado da amostra CR3b

B- RNA total extraído de raízes de arroz 7 dias após inoculação com *H. seropedicae* SmR1

- 9- RNA total da amostra CR7a
- 10- RNA total da amostra CR7b
- 11- RNA total da amostra IR7b
- 12- RNA total depletado da amostra CR7a
- 13- RNA total depletado da amostra CR7b
- 14- RNA total depletado da amostra IR7b
- 15- RNA total da amostra IR7a
- 16- RNA total depletado da amostra IR7a

FIGURA 12 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE RNA TOTAL ANTES E APÓS REMOÇÃO DE RNA RIBOSSOMAL

FONTE: A autora (2013)

5.4 MAPEAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA AS BIBLIOTECAS DE RNA-seq 3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO

Após o sequenciamento foi obtido um total de 198 milhões de leituras de sequências com 50 pares de bases (pb) cada. Como descrito na seção de material e métodos as sequências foram analisadas com os programas SAET e CLC Genomic Workbench. O SAET foi utilizado para corrigir erros de sequenciamento e nessa etapa foram recuperadas 482.922 das 2.327.143 de sequências que seriam perdidas. Em seguida as sequências foram submetidas a um filtro de qualidade, que seleciona sequências com escore de qualidade maior que 0,05 e descarta leituras com tamanho menor que 20 pb, através do programa CLC Genomics Workbench. Resultando em 121.870.590 sequências, 61,5% do número inicial de sequências obtidas após o sequenciamento.

Em seguida as sequências foram mapeadas no genoma de *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare, genoma de cloroplasto e de mitocôndria de *Oryza sativa* e finalmente no genoma de *H. seropedicae*. Após o mapeamento no genoma de arroz e análise da expressão diferencial foi observado que 2 genes (LOC_Os09g00999.1 e LOC_Os09g01000.1) continham 44,7% das sequências mapeadas. Ao extrair a sequência consenso do alinhamento das sequências nestes genes foi observada uma alta similaridade com os genes ribossomais 17S e 25S. Estas sequências foram então removidas do mapeamento contra os genes anotados de arroz e transferidas para o conjunto de sequências ribossomais. Os números de sequências mapeadas em cada etapa estão na tabela 5. Em torno de 17,8% das sequências obtidas mapearam uma única vez em regiões gênicas anotadas do genoma de arroz, representando 13.838 transcritos expressos (genes) com uma cobertura de pelo menos 2X em pelo menos um dos tratamentos. A maior porcentagem de sequências mapeadas foi contra sequências de RNA ribossomal (média de 64,3%) enquanto que mitocôndria e cloroplasto apresentaram uma média de 0,81 e 0,125% respectivamente. A menor porcentagem de sequências mapeadas era proveniente do genoma de *H. seropedicae* (média de 0,04%). Uma parte das sequências (média de 16,9%) não mapeou nem no genoma de arroz e nem em *H. seropedicae*. Mizuno e colaboradores (2010) obtiveram uma média de 12% de seqüências não mapeadas enquanto que KAWAHARA *et al.* (2012) obtiveram uma média de 38,4% de sequências não mapeadas. O não mapeamento de uma parcela das sequências é

esperado, provavelmente devido a erros de sequenciamento ou até mesmo sequências de micro RNA provenientes da região intergênica do genoma ou transcritos não anotados.

TABELA 5 – RESUMO DO MAPEAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS OBTIDAS COM O GENOMA ANOTADO DE *Oryza sativa*, RNAr, MITOCÔNDRIA, CLOROPLASTO E *H. seropedicae*

Amostra	Número total de seqüências	Número total de seqüências após filtro de qualidade	Número de seqüências mapeadas unicamente ao RGAP7* (%)	Número de seqüências mapeadas unicamente no genoma mitocondrial de <i>Oryza sativa</i> (%)	Número de seqüências mapeadas unicamente ao genoma de cloroplasto de <i>Oryza sativa</i> (%)	Número de seqüências mapeadas em RNAr (%)	Número de seqüências mapeadas em <i>H. seropedicae</i> SmR1 (%)	Número de seqüências não mapeadas (%)
CR3aRun1	10.403.160	7.249.398	1.184.230 (16,3)	55.647 (0,8)	8.163 (0,1)	4.982.748 (68,7)		1.018.610 (14,1)
CR3aRun2	27.168.604	17.317.465	3.453.143 (19,9)	184.881 (1,1)	30.559 (0,2)	10.449.894 (60,3)		3.198.988 (18,5)
CR3bRun1	16.696.827	11.776.818	1.912.170 (16,2)	87.095 (0,7)	13.107 (0,1)	8.369.326 (71,1)		1.395.120 (11,8)
CR3bRun2	47.319.130	28.755.639	5.706.266 (19,8)	298.964 (1,0)	50.901 (0,2)	17.942.401 (62,4)		4.757.107 (16,5)
IR3aRun1	17.123.343	12.441.077	1.591.802 (12,8)	64.079 (0,5)	8.905 (0,1)	9.284.329 (74,6)	6.292 (0,0506)	1.485.670 (11,9)
IR3aRun2	34.391.746	20.557.530	2.944.904 (14,3)	140.643 (0,7)	21.072 (0,1)	14.217.999 (69,2)	6.827 (0,0332)	3.226.085 (15,7)
IR3bRun1	8.076.315	5.465.191	1.050.215 (19,2)	49.049 (0,9)	6.938 (0,1)	3.373.012 (61,7)	3.759 (0,0688)	982.218 (18,0)
IR3bRun2	36.964.475	18.307.472	4.332.942 (23,7)	208.874 (1,1)	33.637 (0,2)	8.466.831 (46,2)	74 (0,0004)	5.265.114 (28,8)
Total	198.143.600	121.870.590	22.175.672	1.089.232	173.282	77.086.540	16.952	21.328.912
CR7aRun1	141.889.184	91.009.317	12.692.481 (13,9)	432.801 (0,5)	171.461 (0,2)	35.602.157 (39,1)		42.110.417 (46,3)
CR7bRun1	74.178.948	41.411.264	8.068.476 (19,5)	242.681 (0,6)	145.832 (0,4)	23.334.249 (56,3)		9.620.026 (23,2)
IR7aRun1	60.944.261	41.773.493	9.181.814 (22,0)	32.165 (0,1)	25.357 (0,1)	5.103.570 (12,2)	68.898 (0,1649)	27.361.689 (65,5)
IR7bRun1	51.384.452	32.344.971	8.043.735 (24,9)	21.931 (0,1)	88.731 (0,3)	11.773.321 (36,4)	40.447 (0,1250)	12.376.806 (38,3)
Total	328.396.845	206.539.045	37.986.506	729.578	431.381	75.813.297	109.345	91.468.938

As amostras de raízes de arroz não inoculadas (C) e inoculadas (I) com *H. seropedicae* 3 e 7 dias após a inoculação tiveram seu RNA extraído em duplicata biológica (a e b). Dessa forma as amostras foram nomeadas de CR3a e CR3b (amostras não inoculadas, 3 dias após inoculação); IR3a e IR3b (amostras inoculadas, 3 dias após inoculação); CR7a e CR7b (amostras não inoculadas, 7 dias após a inoculação); IR7a e IR7b (amostras inoculadas, 7 dias após inoculação). Algumas amostras foram resequenciadas, essas repetições foram chamadas de *Run* seguida do número da corrida.

FONTE: A autora (2013)

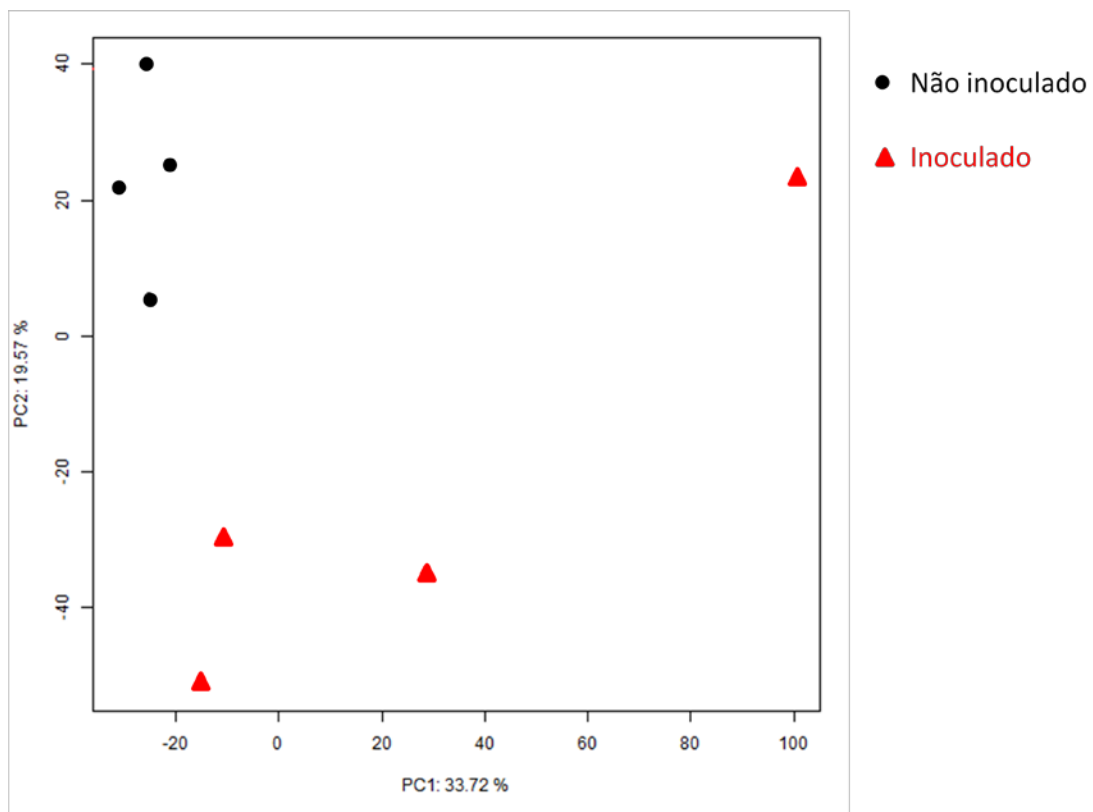
NOTA: * RGAP7, genoma de arroz (rice.plantbiology.msu.edu/)

As bibliotecas foram comparadas através da análise de componente principal (PCA). Esta análise estatística utiliza transformação ortogonal de um conjunto de observações de variáveis provavelmente correlacionadas em um conjunto de valores linearmente não correlacionados chamada de componente principal. É utilizada para se ter uma visão geral dos dados e para verificar possíveis conexões entre eles.

O resultado da análise de PCA é visualizado através de gráficos onde os eixos originais são substituídos por eixos de componentes principais, e dependem dos valores atribuídos para cada amostra e para cada variável. O primeiro componente principal apresenta a maior variação do conjunto de dados, e cada componente subsequente cobre tanto quanto possível o restante da variação. Os diagramas de dispersão, portanto, são gráficos que indicam a posição das amostras ao longo dos componentes principais. Amostras com maior similaridade em um determinado componente principal estarão mais próximas no gráfico (ENGKILDE *et al.*, 2007; GOTTLIEB *et al.*, 2004).

O gráfico de PCA foi obtido através do software DESeq e está mostrado na FIGURA 13. As bibliotecas de raízes não inoculadas e inoculadas estão separadas nesta análise mostrando que são diferentes. Entretanto a biblioteca IR3bRun2 não agrupou com as outras bibliotecas inoculadas e por isso foi retirada das análises posteriores. Além disso, o grau de correlação entre as bibliotecas produzidas foi determinado. Para isso foi feito um gráfico de dispersão da expressão gênica medida em RPKM para as replicatas biológicas e o teste estatístico de Pearson foi aplicado para verificar o grau de correlação entre as amostras. As replicatas biológicas apresentaram um elevado grau de correlação ($R^2 = 0,97 - 0,98$, FIGURA 14B e 14A) dos níveis de expressão gênica, o que indica que as repetições apresentam boa reprodutibilidade. Devido a alta correlação, foi somado o número de sequências obtido para cada tratamento e o RPKM foi calculado a partir do valor total. Os novos valores de RPKM foram comparados entre os tratamentos não inoculado (controle) e inoculado com *H. seropedicae*. A correlação entre os tratamentos (controle e inoculado) também foi alta ($R^2 = 0,967$; FIGURA 14C). Este grau de correlação é próximo do valor observado por Kawahara *et al.* (2012) (0,95) quando compararam os dados de RNA-seq de arroz não inoculado com arroz inoculado com o patógeno *Magnaporthe oryzae* em uma interação compatível (onde

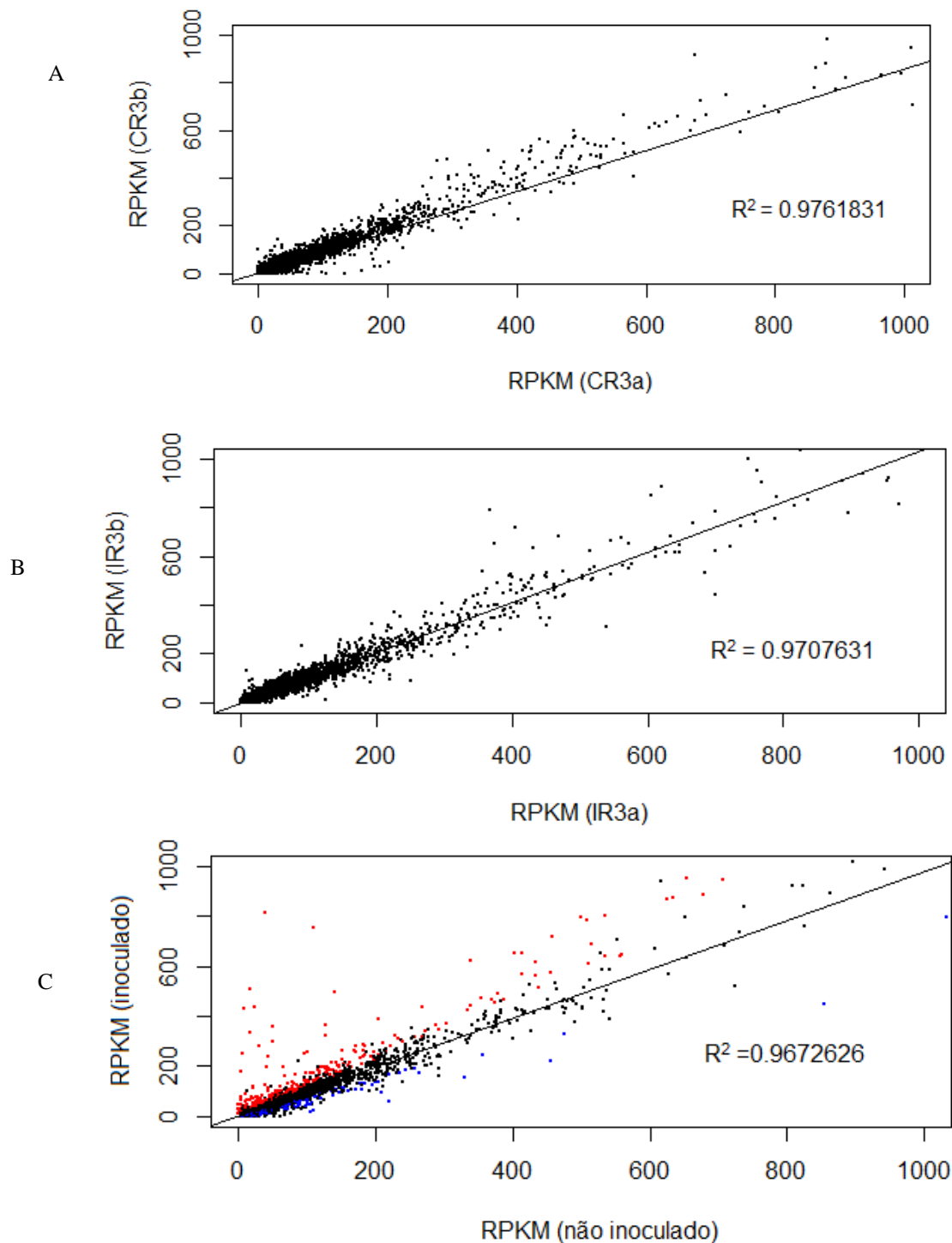
o hospedeiro é suscetível ao patógeno). Estes resultados sugerem que a resposta da planta de arroz a *H. seropedicae*, quando levado em consideração todos os genes que são expressos na planta, é relativamente fraca. O que não significa que a planta não responde a bactéria. Estes resultados estão em concordância com os resultados da análise fenotípica das raízes e folhas após a inoculação onde foi observada uma pequena diferença entre os tratamentos, estatisticamente não significativa.



O eixo X corresponde ao componente principal 1 e o eixo y corresponde ao componente principal 2. Os círculos representam as bibliotecas não inoculadas e os triângulos representam as bibliotecas inoculadas com *H. seropedicae*.

FIGURA 13 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DAS BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ 3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae* SmR1

FONTE: A autora (2013)



A distribuição dos níveis de expressão dos transcritos de arroz é mostrada em A para as replicatas biológicas do tratamento inoculado com *H.seropedicae*, em B para as replicatas biológicas do tratamento não inoculado (controle) e em C os tratamentos inoculado e não inoculado são comparados. Transcritos diferencialmente expressos ($p < 0,05$) entre as condições, inoculado e não inoculado com *H. seropedicae* são plotados em: azul (reprimidos) ou vermelho (induzidos). O coeficiente da correlação de Pearson (R^2) entre as condição é mostrada no gráfico.

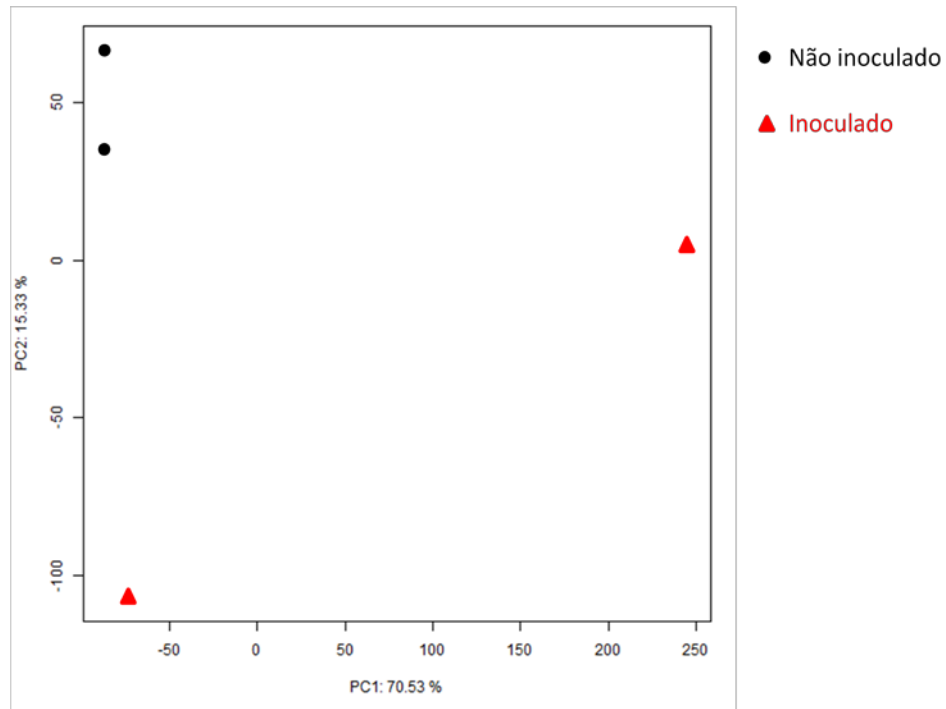
FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA (RPKM) PARA OS TRANSCRITOS ANOTADOS DE ARROZ NAS BIBLIOTECAS DE RAÍZES DE ARROZ 3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO

FONTE: A autora (2013)

5.5 MAPEAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA AS BIBLIOTECAS DE RNA-seq 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO

Após o sequenciamento foi obtido um total de 328 milhões de leituras de sequências com 50 pares de bases (pb) cada. Sendo que destas após filtro de qualidade restaram 206,5 milhões de sequências. Estas foram mapeadas no genoma nuclear, genoma de cloroplasto e de mitocôndria de *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare e finalmente no genoma de *H. seropedicae*. Como no mapeamento da biblioteca de 3 dias as sequências mapeadas nos genes LOC_Os09g009999.1 e LOC_Os09g01000.1 foram removidas do alinhamento contra o genoma anotado de arroz. Os números de sequências mapeadas em cada etapa estão na tabela 5. Em torno de 20,1 % das sequências mapearam em regiões anotados do genoma do arroz. A maior porcentagem de sequências mapeadas foi contra sequências de RNA ribossomal (média de 36%) e o mapeamento contra mitocôndria e cloroplasto apresentou uma média de 0,325 e 0,25% respectivamente. A menor porcentagem de sequências mapeadas era proveniente do genoma de *H. seropedicae* (média de 0,1438%). Enquanto que a porcentagem de sequências não mapeadas foi de 44,3% (TABELA 5).

As replicatas biológicas do tratamento inoculado não foram agrupadas pela análise de PCA (FIGURA 15). Além disso, o coeficiente de correlação destas amostras foi baixo. Com esses resultados é preciso resequenciar essas amostras para determinar se foi um problema de sequenciamento ou se é algum problema intrínseco da amostra.

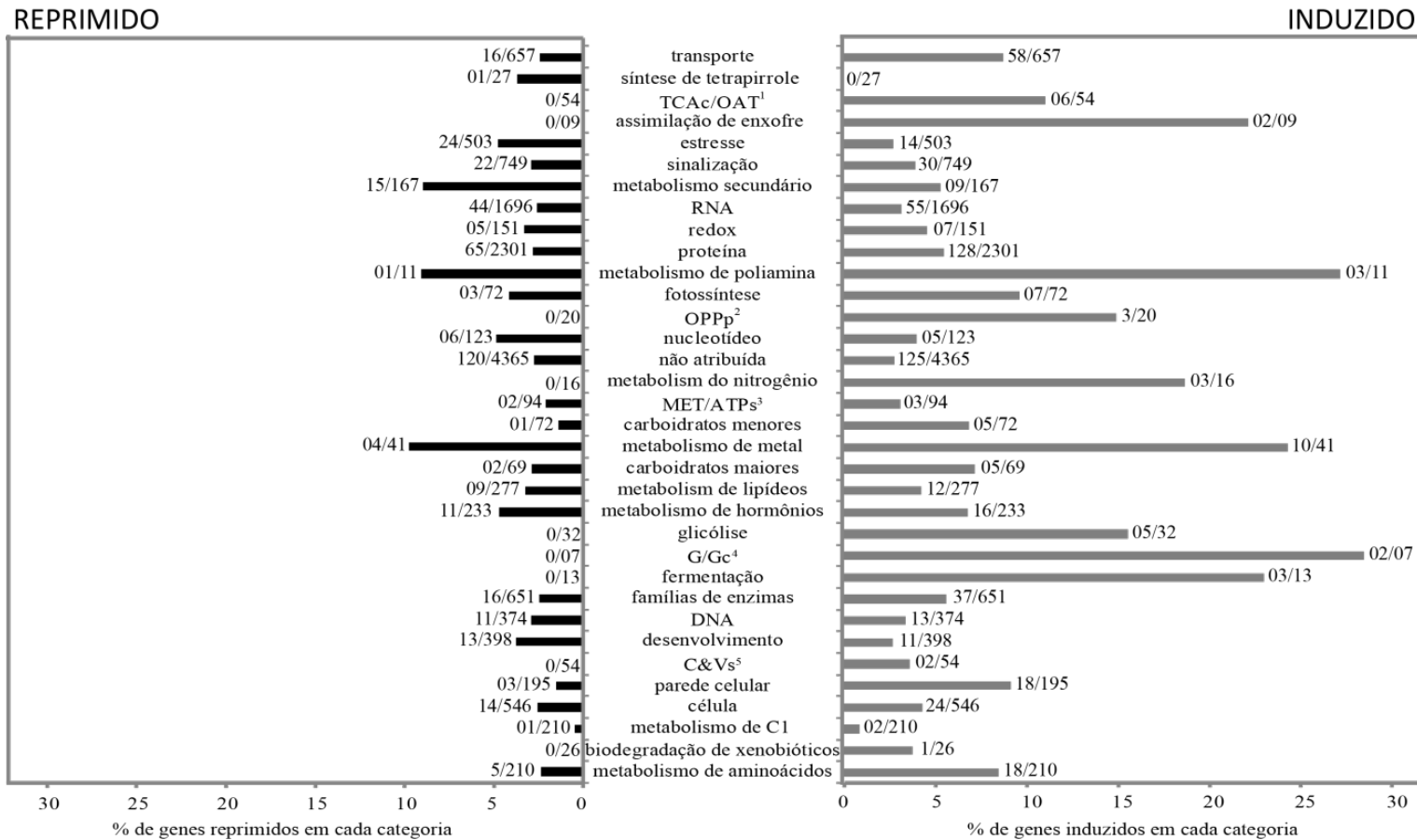


O eixo X corresponde ao componente principal 1 e o eixo y corresponde ao componente principal 2. Os círculos representam as bibliotecas não inoculadas e os triângulos representam as bibliotecas inoculadas com *H. seropedicae*.

FIGURA 15 – ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DAS BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO COM *H. seropedicae* SmR1
FONTE: A autora (2013)

5.6 ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DAS PLÂNTULAS DE ARROZ 3 DIAS APÓS INOCULAÇÃO

Para a análise dos genes diferencialmente expressos foram selecionados os genes com cobertura de sequências de pelo menos duas vezes o tamanho do gene. Em seguida, este conjunto de genes foi analisado com o programa DESeq (ANDERS, HUBER 2010) e 1019 genes diferencialmente expressos foram obtidos com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Entre estes, 256 apresentaram pelo menos 2 vezes de indução ou repressão em relação ao controle (variação da expressão ≥ 2 ou ≤ 2). Os genes diferencialmente expressos foram avaliados, quanto a sua provável função através da utilização do programa MapMan (mapman.gabipd.org/). A classificação funcional geral das vias metabólicas mostra a porcentagem de genes, com cobertura do gene maior que 2 vezes, regulados em cada classe em relação ao total de genes expressos. As classes com maior porcentagem de genes induzidos foram: gluconeogênese/ciclo do glioxilato (28,6%; 01/07), metabolismo de poliaminas (27,3%; 03/11), metabolismo de metais (24,4%; 10/41), fermentação (23,1%; 03/13) e metabolismo de nitrogênio (18,8%; 03/16). Entre os genes reprimidos por *H. seropedicae* as classes mais representativas foram: metabolismo de metais (9,8%; 04/41), metabolismo de poliaminas (9,1%; 01/11), metabolismo secundário (9,0%; 15/167), metabolismo de hormônios (4,7%; 11/233); estresse (4,8%; 24/503) e metabolismo de nucleotídeos (4,9%; 06/123). O restante das classes funcionais encontradas estão mostradas na figura 16. Entre estas classes funcionais, as que possuem maior número de genes regulados (induzidos e reprimidos, com variação da expressão ≥ 2 ou ≤ 2) são: metabolismo de metais, estresse, metabolismo de hormônios e metabolismo secundário. Por esse motivo essas categorias foram analisadas e discutidas com maior profundidade. Em relação aos genes mapeados de mitocôndria e cloroplasto, estes foram analisados quanto ao número de genes diferencialmente expressos. Ambos apresentaram apenas um gene diferencialmente expresso com $p < 0,05$ e codificam uma proteína hipotética de mitocôndria e uma proteína ribossomal L33 de cloroplasto.



Gene induzidos estão representados à direita (em cinza) e os genes reprimidos estão à esquerda (em preto). O número de genes regulados e o total de genes expressos em cada classe estão ao lado de cada coluna. ¹ ciclo dos ácidos tricarboxílicos/transporte ácidos orgânicos, ² via das pentoses-fosfato, ³ transporte de elétron mitocondrial/síntese de ATP, ⁴ gliconeogênese/ciclo glioxilato, ⁵ síntese de vitamina e cofator. Foram considerados como transcritos diferenciantemente expressos os que apresentaram cobertura do gene de pelo menos 2 vezes e p-value < 0,05.

FIGURA 16 – TRANSCRITOS DIFERENCIAMENTE EXPRESSOS EM RAÍZES DE ARROZ INOCULADOS POR *H.seropedicae* SmR1 CLASSIFICADOS FUNCIONALMENTE PELO PROGRAMA MAPMAN

FONTE: A autora (2013)

5.6.1 Metabólitos secundários

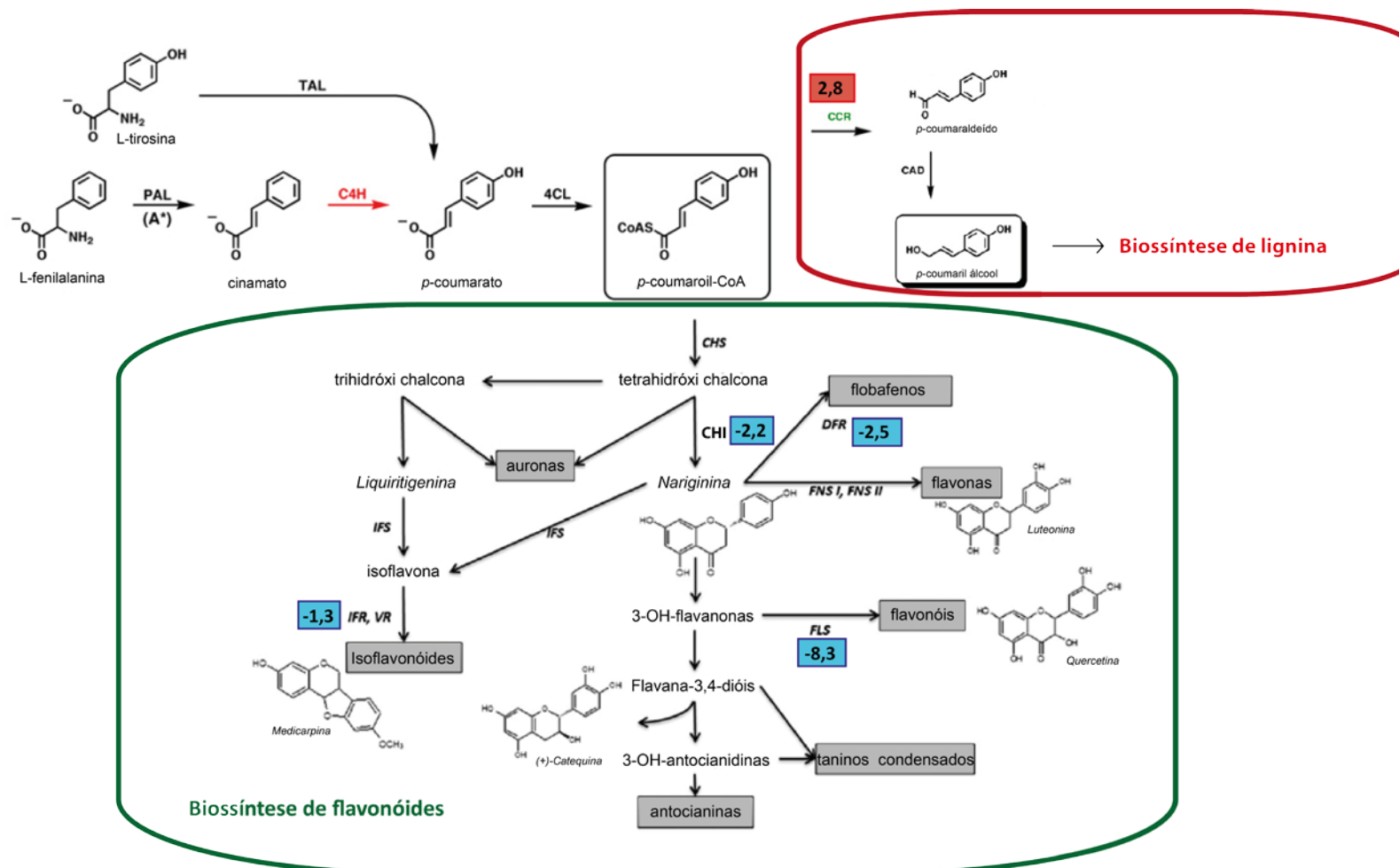
Entre as vias de metabólitos secundários, com maior número de genes regulados (com variação da expressão ≥ 2 ou ≤ 2) está a biossíntese de fenilpropanóides, a síntese de isoprenóides e a via de metabolismo de metais. A tabela 6 mostra os genes diferencialmente expressos envolvidos no metabolismo secundário.

Fenilpropanóides é uma classe de metabólitos secundários que podem ser sintetizados a partir da deaminação do aminoácido L-fenilalanina pela enzima L-fenilalanina amônia-liase (PAL) para sintetizar ácido cinâmico. Este composto por sua vez é hidroxilado pela enzima ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) produzindo ácido p-cumárico. O ácido p-cumárico tem seu grupo carboxil ativado por uma ligação tioéster com CoA pela enzima p-cumaroil:CoA (4CL) produzindo p-cumaroil:CoA. A partir deste composto duas vias podem ser seguidas: biossíntese de flavonóides e a biossíntese de lignina que irá compor a parede celular da planta (HASSAN; MATHESIUS 2012; FERRER *et al.*, 2008). As vias de síntese de fenilpropanóides podem produzir um grande número de compostos de funções biológicas diversas como: desnaturantes de proteínas, antioxidante, agentes de defesa e moléculas sinalizadoras (TAHARA, 2007). Estas vias envolvem um conjunto de enzimas que são consideravelmente bem estudadas e estão resumidas na FIGURA 17 (HASSAN; MATHESIUS, 2012; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012).

TABELA 6 – GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO SECUNDÁRIO

Gene ID	Produto do gene/ descrição	Variação de expressão	Valor -p	P-ajustado
Genes envolvidos na biossíntese de isoprenóides				
LOC_Os07g09190.1	Possível transcetolase, expressa (MSU) Similar a precursor 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase 2 (RAP-DB)	-5,9	0,00134	0,10352
LOC_Os01g01710.1	Possível 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato reductoisomerase, expressa (MSU e RAP-DB)	-1,8	0,00123	0,09631
LOC_Os01g58790.2	Possível proteína ligante de ATP GHMP quinase, expressa (MSU) Similar a 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinase. (RAP-DB)	-1,5	0,03216	0,58734
LOC_Os02g39160.1	Possível hidroximetilbutenil 4-difosfato sintase, expressa (MSU) Similar a proteína de biossíntese isoprenóide (RAP-DB)	-1,3	0,04248	0,64810
LOC_Os03g52170.1	Possível 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase, expressa (MSU) Similar a Isopentenil/dimetilalil difosfato sintase (RAP-DB)	-1,5	0,04368	0,65507
LOC_Os07g39270.1	Possível poliprenil sintetase, expressa (MSU) Similar a GGDP sintase (RAP-DB)	-2,6	6,71E-06	0,00132
LOC_Os11g28530.2	Possível terpeno sintase, expressa (MSU) Similar a estemareno-13-ene sintase (RAP-DB)	-1,9	0,00155	0,11238
Biossíntese de lignina				
LOC_Os02g56700.1	Possível dehidrogenase, expressa (MSU) Similar a Cinnamoil-CoA redutase (RAP-DB)	2,8	8,02E-06	0,00156
Biossíntese de isoflavonóides				
LOC_Os12g02370.2	Possível chalcona--flavonona isomerase, expressa	-2,2	0,00010	0,01473
LOC_Os06g44180.1	Possível proteína da família epimerase/dehidratase dependente de NAD, expressa (MSU) Similar a NADPH HC toxina redutase. (RAP-DB)	-2,5	0,63608	0,03993
LOC_Os03g03034.1	Possível flavonol sintase/flavanona 3-hidroxilase, expressa (MSU) Similar a proteína Flavanona 3-hidroxilase-like (RAP-DB)	-8,3	3,44E-07	9,35E-05
LOC_Os12g16280.1	proteína expressa (MSU) Similar a proteína Isoflavona redutase-like 1 (RAP-DB)	-1,3	0,00786	0,31836
Entre parênteses está indicado o banco de anotação do genoma que pode ser <i>The Rice Annotation Project</i> RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/) ou MSU <i>Rice Annotation Project</i> (http://rice.plantbiology.msu.edu/).				

FONTE: A autora (2013)



A figura ilustra a via de biossíntese de fenilpropanóides que pode levar a biossíntese de lignina ou a biossíntese de flavonoides. As enzimas envolvidas nessa via estão em negrito e com as seguintes abreviações: PAL, L-fenilalanina amônia-liase; C4H, ácido cinâmico 4-hidroxilase; 4CL, p-coumaroil:CoA; CCR, cinamoil COA redutase; CHS, chalcona sintase; DFR, dihidroflavonol 4-redutase; FSI/II, flavona sintase I/II; FLS, flavonol sintase; IFS, isoflavona sintase; IFR, isoflavona redutase; LCR, leucoantocianidina redutase; VR, vestitona redutase. As caixas marcadas em azul indicam o valor da variação da expressão em azul (reprimido) e em vermelho (induzido).

FIGURA 17: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES

FONTE: Adaptado de HASSAN; MATHESIOUS (2012); FERRER *et al.* (2008)

Na via de biossíntese de flavonóides 4 genes estão reprimidos pela presença de *H. seropedicae*. Entre elas encontramos a enzima chalcona isomerase (CHI) que é a segunda enzima mais importante da via, e catalisa a síntese de naringenina a partir da tetrahidroxi-chalcona (NAOUMKINA *et al.*, 2010). O gene desta enzima foi reprimido 2,1 vezes nas raízes inoculadas com *H. seropedicae* (FIGURA 17, TABELA 6). A partir da naringenina, outros compostos podem ser formados, como o flavonol, pela flavonol sintase (FS), isoflavonóides pela isoflavona redutase (IFR) e antocianinas pela dihidroxiflavonol 4-redutase (DFR). Os genes destas enzimas foram reprimidos 8,3; 1,3 e 2,5 vezes pela bactéria, respectivamente (FIGURA 17, TABELA 6). O gene com maior valor de repressão codifica a flavonol sintase que catalisa a síntese de flavonol. Flavonóis como a quercetina podem apresentar atividade antimicrobiana. Estudos mostraram que a quercetina é capaz de se ligar a DNA girase de *Escherichia coli* e inibir sua atividade de ATPase (PLAPER *et al.*, 2003). Além disso, a quercetina é o componente com maior atividade antimicrobiana da folha de *Lotus* e mostrou atividade contra cinco microrganismos (LI; XU, 2008). Dessa forma, fenilpropanóides têm sido descritos como importantes componentes do mecanismo de defesa das plantas. Além disso, relatos mostram que fenilpropanóides podem estar envolvidos na resistência ao ataque por patógenos (NAOUMKINA *et al.*, 2010; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012).

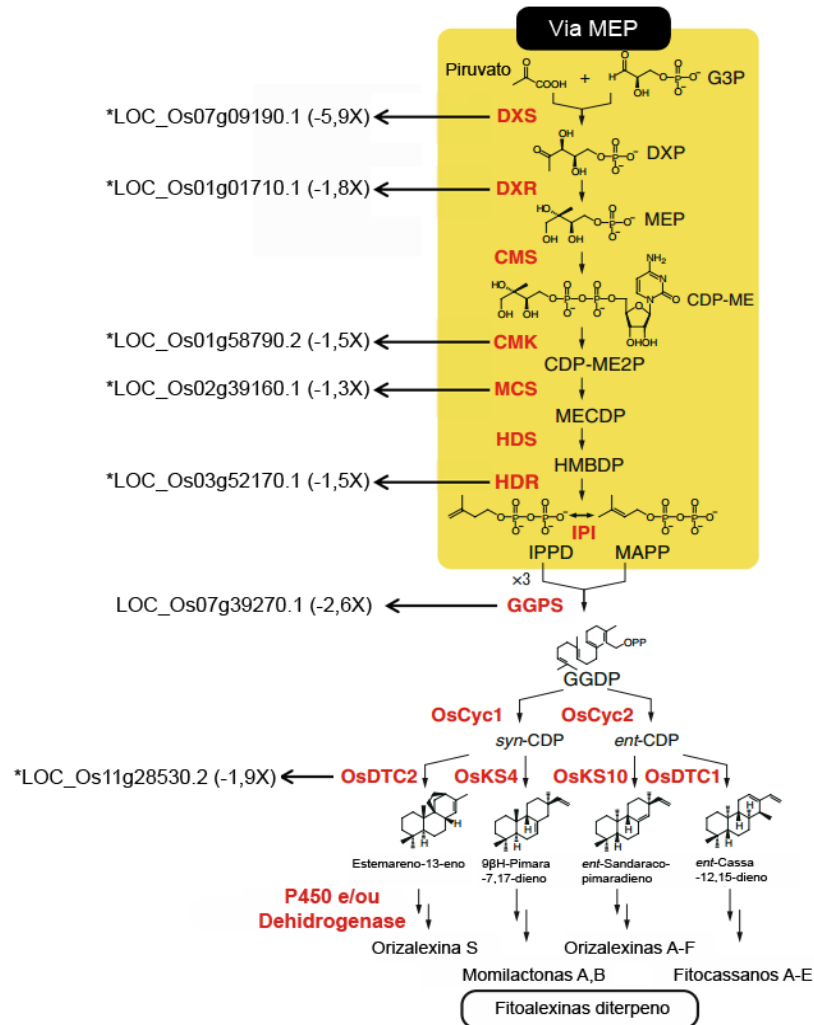
Naoumkina *et al.* (2010) utilizou um banco de dados de microarranjo e avaliou a expressão de genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanóides de plantas inoculadas com patógenos. Em plantas de arroz eles observaram a indução da flavononas 3 β -hidroxilase em resposta à inoculação com *Xanthomonas oryzae*. Também em arroz, a indução de genes que codificam DFRs e CHS, envolvidos na biossíntese de fenilpropanóides, foi observada quando inoculada com o fungo *Magnaporthe oryzae*. Outro estudo com soja mostrou que a expressão de genes envolvidos na biossíntese de flavonóides, como chalcona sintase, chalcona isomerase e isoflavona sintase, foi induzida nos estágios inicial e tardio da infecção por *Phakopsora pachyrhizi* (van de MORTEL *et al.*, 2007). Portanto, a repressão de genes envolvidos na biossíntese de flavonóides sugere que o sistema de defesa está atenuado em raízes de arroz colonizadas por *H. seropedicae*.

Além da via de biossíntese de flavonóides, p-cumaroil:CoA pode levar a biossíntese de lignina que irá compor a parede celular. Esta via pode ser utilizada tanto para o desenvolvimento da planta como pode estar relacionado com mecanismo de defesa, pois uma das etapas da defesa é o espessamento da parede celular para proteger da invasão por patógenos. Em arroz, a enzima cinamoil CoA redutase 1 (CCR1) está envolvida na biossíntese de lignina. A expressão de CCR1 é aumentada pela presença de um esfingolípido (cerebrosídeo) elicitor de *M. grisea* e *Rhizoctonia* sp, sugerindo seu envolvimento na resposta de defesa (KAWASAKI *et al.*, 2006). Além disso, CCR1 interage com o efetor OsRac1, uma pequena GTPase que está envolvida na ativação da defesa da planta, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Esta interação, entre OsRac1 e CCR1 levou a ativação enzimática de CCR1 in vitro produzindo acúmulo de lignina e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (KAWASAKI *et al.*, 2006). Cinamoil CoA redutase 2 também é induzida em *Arabidopsis thaliana* inoculada com o patógeno *Xanthomonas campestris* (LAUVERGEAT *et al.*, 2001). Nas bibliotecas de raiz de arroz produzidas foi encontrado um gene que codifica cinamoil CoA redutase. Este se encontra induzido 2,8 vezes em plântulas de arroz inoculadas com *H. seropedicae* (FIGURA 17; TABELA 6).

A via de biossíntese de isoprenóides (ou terpenóides) também está reprimida em raízes de arroz inoculadas com o diazotrofo *H. seropedicae*. Isoprenóides são compostos derivados da combinação da ligação de compostos isoméricos de 5 carbonos de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) (CHEN *et al.*, 2011). Os isoprenóides podem ser sintetizados através de duas vias: via do mevalonato (MEV) e via do metil-eritritol fosfato (MEP) (FIGURA 18). A via MEV ocorre no citoplasma e a via MEP nos plastídeos de planta (VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM, 2013). A diversidade de moléculas de isoprenóides é enorme, estima-se que existem na natureza acima de 55.000 tipos de moléculas de isoprenóides.

Os genes da via MEP em raízes de arroz foram reprimidos pela presença de *H. seropedicae*. O gene com maior valor de repressão (5,9 vezes) codifica a primeira enzima da via: 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS), que sintetiza 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) a partir de piruvato e D-gliceraldeído 3-fosfato. Isoprenóides podem ser utilizados para a biossíntese de compostos antimicrobianos como as fitoalexinas (OKADA *et al.*, 2007). Okada *et al.* (2007) analisou a expressão gênica

de cultura de células de arroz tratadas com o elicitor quitina e observou que a via MEP foi induzida pelo tratamento e observou aumento de fitoalexinas. Além disso, o tratamento com inibidores das enzimas DXS e 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) levou a uma diminuição na biossíntese de fitoalexinas. Os autores sugerem que a ativação da via MEP é necessária para suprir a demanda de isoprenóides para a síntese de fitoalexinas em células infectadas. Além da repressão do gene de DXS, nos dados de RNA-seq de arroz inoculado observou-se uma repressão de 1,9 vezes do gene que codifica a enzima estemareno-13-ene sintase (OsDTC2), uma das enzimas envolvidas na biossíntese de fitoalexinas em arroz (FIGURA 18).



Essa via corresponde a via de biossíntese de diterpenóides em arroz. A via de metileritritol fosfato (MEP) leva biossíntese de geranilgeranil difosfato e a via de biossíntese de diterpenóides. G3P, gliceraldeído 3-fosfato; DXP, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato, MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato; CDP-MEP, 4-(cistidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol; CDP-ME2P, 2-fosfo-4-(cistidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol; MECDP, 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBDP, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4 difosfato; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GGDP, geranilgeranil difosfato e CDP, copalil difosfato. As **enzimas** envolvidas na via MEP e 6 diterpeno ciclases estão indicadas em vermelho e em negrito: **DXS**, DXP sintase; **DXR**, DXP reductoisomerase; **CMS**, CDP-ME sintase; **CMK**, CDP-ME kinase; **MCS**, MECDP sintase; **HDS**, HMBDP sintase; **HDR**, HMBDP redutase; **IPI**, IPP isomerase; **GGPS**, GGDP sintase; **OsCyc1**, sin-CDP sintase; **OsCyc2**, ent-CDP sintase; **OsDTC1**, ent-cassa-12,15-diene sintase; **OsDTC2**, estemareno-13-ene sintase; **OsKS4**, 9bH-pimara-7,15-diene sintase e **OsKS10**, ent-sandaracopimaradieno sintase. Na figura está indicado o número do locus de cada gene encontrado diferencialmente expresso com o valor da variação da expressão entre parênteses. Em asterisco estão marcados os genes de arroz que foram os mesmos analisados por OKADA *et al.* (2007). A lista completa de genes regulados está na tabela 6.

FIGURA 18: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE ISOPRENÓIDES

FONTE: Adaptado de OKADA *et al.* (2007)

5.6.2 Metabolismo de metais

Íons de metais são constituintes ou cofatores de várias enzimas e proteínas, e são, portanto, elementos essenciais para a planta. A maioria dos genes de raízes de arroz regulados em resposta à inoculação com *H. seropedicae* está relacionada ao metabolismo de metais na planta. Entre os 20 genes de arroz com maior variação da expressão 8 estão ligados ao transporte de metais (TABELA 7).

TABELA 7 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS COM DIFERENÇA DE EXPRESSÃO MAIOR OU MENOR QUE 10 VEZES

Gene ID	Produto do gene/ descrição	Variação de expressão	p - ajustado	Valor - p
Genes induzidos				
LOC_Os02g20360.1	Tirosina aminotransferase, possível, expressa.	10,0	5.89E-27	5.53E-30
LOC_Os04g57410.1	Metiltioribose quinase, possível, expressa.	10,1	5.27E-10	1.07E-12
LOC_Os03g26210.1	Proteína expressa contendo domínio de ligação a DNA hélice volta hélice	12,6	1.57E-06	4.09E-09
LOC_Os01g72370.1	Proteína expressa contendo domínio de ligação a DNA hélice volta hélice	16,4	6.00E-70	1.73E-73
LOC_Os11g15624.1	Proteína expressa	17,7	1.20E-22	1.21E-25
LOC_Os03g13390.2	Proteína da família Oxido-redutase, aldo/ceto redutase, possível, expressa.	19,4	6.70E-08	1.6E-10
LOC_Os02g43410.1	Transposon, possível, não classificada, expressa	20,6	2.23E-77	3.22E-81
LOC_Os10g11889.2	Proteína expressa	23,2	2.93E-07	2.12E-111
LOC_Os01g65110.1	Proteína da família POT , expressa	26,1	3.06E-11	5.97E-14
LOC_Os07g15460.1	Transportador de metal Nramp6, possível, expressa	27,2	1.38E-57	6.96E-61
LOC_Os03g19427.1	Nicotianamina sintase, possível, expressa.	32,0	8.73E-20	1.04E-22
LOC_Os03g46454.1	Transportador metal cátion, possível, expressa.	33,6	1.29E-05	4.01E-08
LOC_Os06g19095.1	Proteína expressa	39,5	8.35E-12	1.51E-14
LOC_Os11g04020.1	Antiporter da superfamília de facilitadores, possível, expressa	39,8	1.31E-47	9.47E-51
LOC_Os03g19420.2	Nicotianamina sintase, possível, expressa.	52,2	2.15E-76	4.66E-80
LOC_Os12g18410.1	Proteína expressa	70,0	0.003672	2.07E-05
LOC_Os03g12510.1	Hemoglobina não-simbiótica 2, possível, expressa.	104,1	5.22E-21	5.66E-24
Genes reprimidos				
LOC_Os09g23300.1	Proteína integral de membrana, possível, expressa.	-17,7	0.005586	3.61E-05
LOC_Os11g15340.2	Proteína da família SAM dependente de carboxil metiltransferase, possível, expressa.	-40,5	0,0014945	0,108867
LOC_Os12g38040.1	Proteína da família de metalotioneínas, expressa.	-48,3	2.74E-19	3.56E-22
LOC_Os10g07556.1	Precursor kinase tipo 22 associado a parede, possível, expressa.	-93,1	1.52E-05	3.61E-05

As gramíneas podem transportar Fe^{3+} do solo utilizando quelantes como fitossideróforos (PS) da família do ácido mugineico (AM) que são liberados no solo e possuem alta afinidade por íons metálicos. O complexo PS- Fe^{3+} é posteriormente capturado através de transportadores de membrana (revisto por HINDT; GUERRINOT, 2012).

A biossíntese de fitossideróforos pode ser dividida em duas etapas, na primeira etapa nicotianamina (NA) é sintetizada a partir da metionina e na segunda ocorre a síntese de fitossideróforos (PS) a partir de nicotianamina (FIGURA 19). A síntese de NA e PS envolve um conjunto de enzimas que catalisa a conversão de L-metionina para o ácido 2'-deoximugineico (DMA). Nicotianamina sintase (NAS) converte a S-adenosilmetionina para nicotianamina e nicotianamina aminotransferase (NAAT) catalisa a transferência do grupo amino de NA para produzir o intermediário 3''-ceto. Este por sua vez, é reduzido pela ácido deoximugineico sintase (DMAS) para produzir 2'- ácido deoximugineico (DMA) (SHOJIMA *et al.*, 1990; BASHIR *et al.*, 2006; HIGUCHI *et al.*, 1999; INOUE *et al.*, 2008).

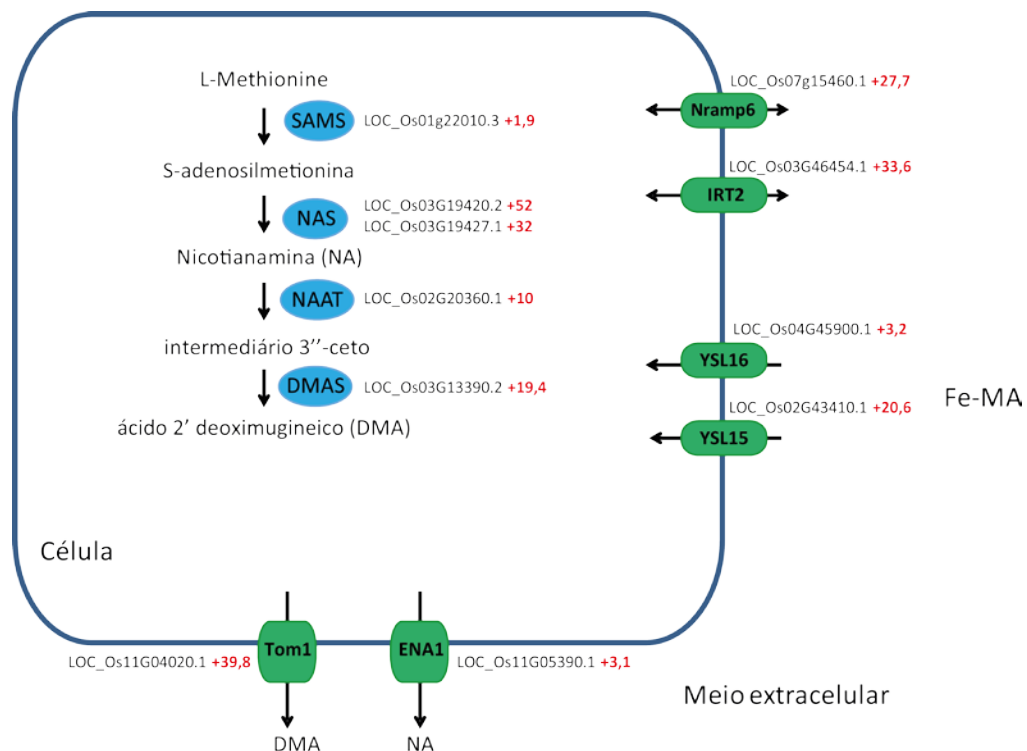


FIGURA 19 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NA VIA DE METABOLISMO DE METAIS

FONTE: A autora (2013)

O mapeamento e análise do transcriptoma de arroz revelaram indução de 52 e 32 vezes de dois genes que codificam nicotianamina sintases (NAS): LOC_Os03g19420.2 e LOC_Os03g19427.1. A NAS catalisa a conversão de SAMS para nicotianamina, um precursor de fitossideróforo (SHOJIMA *et al.*, 1990). Os níveis aumentados de nicotianamina acarretam um aumento nos níveis de Fe em plantas de arroz (LEE *et al.*, 2009). Além disso, em *Lotus japonicus* nicotianamina sintase 2 foi expressa apenas em feixes vasculares de nódulos, sugerindo um papel na fixação simbiótica de nitrogênio (HAKOYAMA *et al.*, 2009). Um mutante de tomate com deficiência na síntese de nicotianamina apresentou metabolismo de ferro alterado (LING *et al.*, 1996). Esses resultados sugerem a participação de nicotianamina no metabolismo de metais em plantas.

Os genes codificadores de outras enzimas da via de síntese de DMA tais como, a NAAT (LOC_Os02g20360.1) e DMAS (LOC_Os03g13390.2) também estão induzidos 10 e 19,4 vezes em raízes de arroz colonizados por *H. seropedicae*. Previamente foi relatado que plantas de arroz em condições de deficiência de Fe induzem a expressão do gene OsNAAT1 (INOUE *et al.*, 2008). Estes resultados indicam que plantas colonizadas por *H. seropedicae* se comportam como na condição de deficiência de Fe, uma vez que a síntese de PS é fortemente induzida nessa condição (TAKAGI, 1976; TAKAGI; NOMOTO; TAKEMOTO, 1984).

Recentemente foi mostrado que membros da superfamília do facilitador principal (*major facilitator superfamily*) são essenciais para o efluxo de ácido deoximugineico (DMA) e nicotianamina (NA) em arroz. A proteína transportadora TOM1 está envolvida no efluxo de DMA, e as proteínas transportadoras ENA1 e ENA2 transportador no efluxo de NA (NOZOYE *et al.*, 2011). Os dados de expressão de RNA-seq mostraram uma indução de 39,8 vezes de *tom1* (LOC_Os11g04020.1) e 3,1 vezes de *ena1* (LOC_Os11g05390.1) em plantas de arroz inoculadas. Além disso, outros transportadores de metais como Nramp6 (LOC_Os07g15460.1) também estão regulados em raízes de arroz colonizadas por *H. seropedicae*. Membros da família NRAMP (“Natural Resistance-Associated Macrophage Protein”) são co-transportadores de cátions/prótons de metais de transição ou anti-porter de alta especificidade. Em plantas transgênicas de *Arabidopsis* a superexpressão de AtNRAMP6 levou a hipersensibilidade a cádmio. Portanto a provável função de AtNRAMP6 é transportar cádmio. No entanto outros metais podem também ser transportados por esta proteína (IWAI *et al.*, 2002). A expressão de Nramp6 foi

induzida 27,2 vezes, de acordo com os dados de RNA-seq obtidos, indicando que de fato o transporte de metais está ativo em raízes de arroz inoculadas.

Após a etapa de quelação de Fe por fitossideróforos o complexo tem de ser transportado para o interior da planta. Em gramíneas, dois grupos de transportadores do complexo Fe-MA estão presentes: ZmYS1, descrita pela primeira vez em milho (CURIE *et al.*, 2001) e a família de transportador YSL (YSL-like). Inoue *et al.* (2009) analisaram a expressão de 18 genes YSL em arroz e observaram a indução da expressão gênica, sob condição de deficiência de Fe, de apenas OsYSL15 e OSYSL16. Outros estudos têm mostrado que OsYSL2 transporta Fe^{2+} -NA (ISHIMARU *et al.*, 2010) e OsYSL15 Fe^{3+} -DMA (KAKEI *et al.*, 2012). Os dados de expressão aqui obtidos mostraram uma indução de 3,2 vezes de OsYSL16 (LOC_Os04g45900.1) e uma indução de 20,6 vezes de OSYSL15 (LOC_Os02g43410.1). Além disso, detectamos uma indução de 33,6 vezes do transportador OsIRT2 (LOC_Os03g46454.1) em plantas inoculadas. Os transportadores OsIRT1 e OsIRT2 também foram induzidos por baixas condições de Fe (ISHIMARU *et al.*, 2006).

O metal Fe é importante para processos biológicos como a fotossíntese e biossíntese de clorofila. Além disso, é elemento essencial para várias enzimas, tais como o complexo nitrogenase e hemoglobinas não-simbióticas. Curiosamente o transcrito com maior valor de indução (104,1 vezes) codifica uma hemoglobina não simbiótica 2 (LOC_Os03g12510.1). Este elevado nível de expressão pode ser responsável pela redução dos níveis de ferro nas raízes inoculadas e consequentemente indução do transporte de Fe para o interior da planta. Além disso, esta proteína poderia captar o oxigênio livre e proteger o complexo da nitrogenase bacteriana, uma vez que este complexo perde atividade na presença do oxigênio. Esta função foi descrita na leguminosa *Lotus japonicus*, onde a inibição da biossíntese de leghemoglobina acarretou em aumento no teor de oxigênio livre e perda de proteína bacteriana nitrogenase e ausência de fixação biológica de nitrogênio em nódulos (OTT *et al.*, 2005).

Existem no genoma do arroz cinco loci que codificam hemoglobina não simbiótica 2 e um locus para a hemoglobina como proteína HbO. Entre essas, Arredondo-Peter *et al.* (1997) descrevem duas hemoglobinas (Hb1 e Hb2) em arroz. A hemoglobina induzida por *H. seropedicae* em arroz é muito semelhante a Hb2 descrita por Arredondo-Peter *et al.* (1997) (cobertura de 82% e com uma identidade

de 97%). Esta Hb2 não foi detectável por RNA-PCR em raízes de arroz em condições normais (ARREDONDO-PETER *et al.*, 1997).

Vigeolas *et al.* (2011) estudaram o efeito da super expressão da hemoglobina não-simbiótica 2 (AHb2) em sementes no desenvolvimento de *Arabidopsis*. A super-expressão de AHb2 levou ao aumento do teor de ácido graxo, mas a super-expressão de AHb1 não causou quaisquer alterações significativas no teor de ácido graxo. Além disso, os autores observaram uma relação ATP/ADP 3 vezes maior e o teor de sacarose 2 vezes maior em sementes superexpressando AHb2. Este trabalho sugere uma função específica para AHb2 na produção do teor e acumulação do ácido graxo polinsaturado nas sementes, provavelmente por facilitar o suprimento por oxigênio.

Lira-Ruan *et al.* (2001) estudaram a síntese de hemoglobinas em arroz sob condições de estresse. Esses autores mostraram que as hemoglobinas são expressas em diferentes órgãos de arroz (raízes e folhas) e durante o desenvolvimento da planta. Sob condições limitantes de O₂ e em arroz estiolado os níveis de hemoglobinas aumentaram. Estresse oxidativo, nitrosativo e hormonal não alteraram os níveis de hemoglobinas em comparação com o controle. Os autores sugeriram que as Hbs não fazem parte de uma resposta de estresse generalizado.

5.6.3 Metabolismo de fito-hormônios

Fito-hormônios agem em várias partes da planta e influenciam diversos processos fisiológicos como crescimento, florescimento e resposta a fatores ambientais (JAIN; KHURANA, 2009; WURIYANGHAN *et al.*, 2009). Fito-hormônios como auxina, etileno e ácido jasmônico também podem influenciar a interação entre planta e bactéria e este tem sido o tema de muitos estudos nos últimos anos (SUKUMAR *et al.*, 2012; ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011; GLICK *et al.*, 2007).

O fito-hormônio auxina (ou ácido indol-acético (AIA)) está envolvido em diversos processos fisiológicos, em particular no crescimento e formação de raízes laterais (PÉRET *et al.*, 2009; LUCAS *et al.*, 2008). A ligação de fatores de resposta a auxina (ARFs) a elementos de resposta a auxina (AuxREs) controla a expressão gênica dependente de auxina. Esta regulação é mediada por proteínas da família Aux/IAA que inibem ARFs. Na presença de altas concentrações de auxina, Aux/IAA

são degradadas pelo proteassoma e ARF é liberada para iniciar transcrição de genes de resposta a auxina (ROGG; BARTEL, 2001; ROBERT-SEILANIANZ; GRANT; JONES, 2011).

Estudos mostram que a aplicação exógena de AIA pode aumentar o número de raízes em plantas de arroz (INUKAI *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2005), uma vez que AIA regula a formação de raízes laterais (PÉRET *et al.*, 2009; LUCAS *et al.*, 2008; MALAMY; BENFEY, 1997). Em arroz mutantes de OsPIN1, um transportador de auxina, mostrou que a sua superexpressão aumenta o número de raízes laterais. Enquanto que super expressão causada pela mutação de OsIAA1, uma proteína da família Aux/IAA, causou diminuição do número de raízes laterais (XU *et al.*, 2005; SONG; YOU; XIONG, 2009). Estes resultados sugerem novamente a participação de AIA na formação de raízes laterais. Além disso genes relacionados a auxina mostraram responder a estresse abiótico em diferentes plantas (JAIN; KHURANA 2009; HANNAH; HEYER; HINCHA, 2005) mas sua resposta parece sobrepor com o estresse biótico (CHEONG *et al.*, 2002).

A análise do transcriptoma de raízes de arroz revelou 5 genes diferencialmente expressos na presença da bactéria e relacionados as vias de sinalização de auxina (listados na TABELA 8). Entre estes, dois genes codificam proteínas de resposta a auxina e dois são induzidos por auxina. Com exceção dos genes LOC_Os01g67030.1 (codifica possível proteína de resposta a auxina) e LOC_Os01g63770 (codifica proteína similar a um transportador de auxina 1) todos os outros foram reprimidos pela presença da bactéria.

TABELA 8 – GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS RELACIONADOS AO METABOLISMO DE FITO-HORMÔNIO

Gene ID	Produto do gene / descrição (MSU)	Variação de expressão	Valor p	p-ajustado
Genes relacionados a via de auxina				
LOC_Os01g67030.1	Possível Proteína responsiva a auxina, expressa	2,5	4,91E-06	0,00098
LOC_Os08g24790.1	Possível proteína de resposta a auxina AIR12, expressa	-2,1	0,036901	0,6168
LOC_Os09g25770.1	Possível proteína induzida por auxina 5NG4, expressa	-1,8	0,01094	0,3729
LOC_Os05g01570.1	Possível proteína induzida por auxina 5NG4, expressa	-2,5	0,049129	0,6785
LOC_Os01g63770.1	Proteína transmembrana transportadora de aminoácido. Similar a proteína tipo transportadora de auxina 1 (RAPDB)	1,5	0,0191	0,4789
Genes envolvidos na biossíntese de etileno				
LOC_Os09g28050.1	Asparato aminotransferase (MSU; RAPDB) Proteína da família 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACC sintase) (RAPDB), transcrito alternativo.	6,1	2,67E-53	4,11E-50
LOC_Os03g63900.1	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase 2 (ACC oxidase)	-2,0	0,0008	0,0709
LOC_Os01g04800.1	Proteína contendo domínio de ligação a DNA B3 (MSU) Proteína 129 de ligação a elemento APETALA2/etileno-responsivo (RAPDB)	2,2	0,0036	0,1964
ABA				
LOC_Os06g10880.1	Possível fator de transcrição bZIP, expressa (MSU) Similar a fatores de ligação a elementos responsivos ao ácido abscísico (proteína 1 de ligação a elemento responsivo a ABA) (AREB1). (RAPDB)	-2.4	0,0267	0,5406
Acido salicílico				
LOC_Os11g15340.2	Possível proteína da família SAM dependente de carboxil metiltransferase, expressa	-40.5	0,0015	0,1089
Genes relacionados ao ciclo de reciclagem de metionina (MTA)				
LOC_Os06g02220.1	MTA/SAH nucleosidase	2,6	2,28E-11	9,87E-09
LOC_Os04g57400.1	Metil-tioribose quinase	6,1	3,16E-18	2,09E-15
LOC_Os04g57410.1	Metil-tioribose quinase	10,2	1,07E-12	5,27E-10
LOC_Os06g04510.1	Similar a Enolase 1	1,9	0,033007	0,5979
LOC_Os03g06620.1	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metil-tiopenteno dioxigenase	7,5	1,13E-63	3,14E-60
LOC_Os10g28360.1	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metil-tiopenteno dioxigenase	-2,1	0,0061	0,2778
LOC_Os01g22010.3	S-adenosil-metionina sintetase (SAM)	1,9	1,70E-05	0,0031

FONTE: A autora (2013)

A repressão de genes envolvidos nas vias de auxina estão de acordo com o resultados de expressão por qPCR obtidos para arroz 7 dias após a inoculação com *H. seropedicae* (FIGURA 6 E 7 do item 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente). A tabela 9 compara a expressão obtida por RT-qPCR com RNA-seq. A maioria dos genes analisados não apresentou resultado estatístico significativo para análise por RNA-seq. Entretanto os genes IAA18 e pbz1 que apresentaram valor p significativo para os valores de expressão obtidos por RNA-seq são reprimidos por *H. seropedicae* através de ambos os métodos.

Navarro *et al.* (2006) mostraram que a resistência de *Arabidopsis* a infecção pelo patógeno *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 é aumentada pela repressão de genes de resposta a auxina. Estes autores sugerem que auxina promove susceptibilidade a doença. Por isso, a produção de AIA e a regulação de genes específicos de resposta a auxina é provavelmente uma importante característica para efetiva colonização da planta por organismos patogênicos ou não.

H. seropedicae possui em seu genoma genes que codificam enzimas para a síntese de auxina, o que justifica em parte o estudo do crescimento vegetal induzido por esse micro-organismo (PEDROSA *et al.*, 2011). Além disso, *H. seropedicae* possui o gene que codifica 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) deaminase (NC_014323; PEDROSA *et al.*, 2011), o qual provavelmente modula a produção de etileno para a planta hospedeira em resposta a auxina.

TABELA 9 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE GENES DE ARROZ POR qRT_PCR E RNA-seq

MSU	RAP-DB	Nome do gene	RQ (quantidade relativa)	Número de sequências mapeadas				3 dias		7 dias	
				3 dias após inoculação		7 dias após inoculação					
				Controle	Inoculado	Controle	Inoculado	Varição de expressão	Valor - p	Varição da expressão	Valor - p
LOC_Os11g47809.1	Os11g0704500	Tipo Metallothioneína 1	1.24±0.09 (1.24)	12906	27351	12842	983	1,3	0,076021	1,4	0,38773
LOC_Os01g70270.1	Os01g0927600	Tipo ARF2	0.69±0.14 (-1.45)	1985	1445	1408	89	1,1	0,295956	1,2	0,604549
LOC_Os02g13520.1	Os02g0228900	Tipo IAA18	0.34±0.08 (-2.81)	178,0	130,0	250,0	0,0	1,1	0,675381	inf reprimido	0,035325
LOC_Os05g48590.1	Os05g0559400	Tipo IAA11	0.64±0.2 (-1.56)	918,0	679,0	1238,0	32,0	-1,1	0,535923	-2,0	0,146232
LOC_Os07g42510.1	Os07g0617000	Tipo ERF2	0.71±0.11 (-1.42)	1035	1322	1058,0	45,0	1,3	0,112697	-1,3	0,673652
LOC_Os03g08460.1	Os03g0182800	Tipo ERF3	2.38±0.33 (2.4)	410	248	231,0	30,0	-1,2	0,242716	2,3	0,210723
LOC_Os09g31200.1	Os09g0486500	OsISAP1	0.57±0.1 (-1.74)	250,0	106,0	949,0	21,0	-1,7	0,102064	-2,5	0,276631
LOC_Os12g36840.1	Os12g0555100	PBZ1	0.28±0.09 (-3.59)	989	305	3381	81	-2,9	0,000147	-2,3	0,421684

FONTE: A autora (2013)

O etileno, outro fito-hormônio importante para a interação planta-bactéria, está envolvido em diversos processos biológicos como a ativação do sistema de resposta de defesa e o crescimento de raízes adventícias (GLAZEBOOK 2005; ROBERT-SEILANIANZ; GRANT; JONES, 2011; LORBIECKE; SAUTER, 1999). A molécula precursora do etileno, o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), é sintetizado pela ACC sintase (ACS) a partir de 5'-adenosilmetionina (AdoMet). Em seguida, ACC é oxidado pela ACC oxidase para então produzir o etileno. O ACC é um dos produtos do ciclo de reciclagem da metionina (ciclo MTA) (AMIR, 2010; ALBERS, 2009; SAUTER *et al.*, 2005).

A primeira reação do ciclo de MTA é catalisada pela S-adenosilmetionina sintetase (SAMS) que sintetiza Adomet a partir do aminoácido metionina. S-adenosil metionina sintase 1 (SAMS1) é induzida em raízes de arroz inoculado com *Sinorhizobium meliloti* (CHI *et al.*, 2010). A reação catalisada por SAMS libera como subproduto a 5'-metil-tioadenosina (MTA) que é então reciclada novamente a metionina. MTA é depurinado a 5-metil-tio-ribose (MTR) pela enzima MTA nucleosidase. Em seguida MTR é fosforilada pela MTR quinase no grupo hidroxila do carbono 1 da ribose para formar a 5-metil-tio-ribose-1-fosfato (MTR-1-P), que por sua vez é convertido a aci-redutona pela enolase 1/fosfatase. No ciclo da metionina aciredutona e oxigênio reagem para produzir 2-ceto-4-metil-tiobutirato (KMTB), precursor da metionina e do formato, reação esta catalisada pela aciredutona dioxigenase (ADR) (AMIR, 2010; ALBERS, 2009; SAUTER *et al.*, 2005).

Os resultados de RNA-seq (3 dias após a inoculação) apresentaram transcritos de enzimas do ciclo MTA e da biossíntese de etileno regulados por *H. seropedicae*. A FIGURA 20 mostra o ciclo MTA, as reações de biossíntese de etileno e os genes encontrados regulados nas raízes inoculadas com *H. seropedicae*. Com exceção da enzima ACC oxidase que sintetiza etileno e da aciredutona dioxigenase (ARD), todas as demais enzimas da via estão induzidas na presença da bactéria.

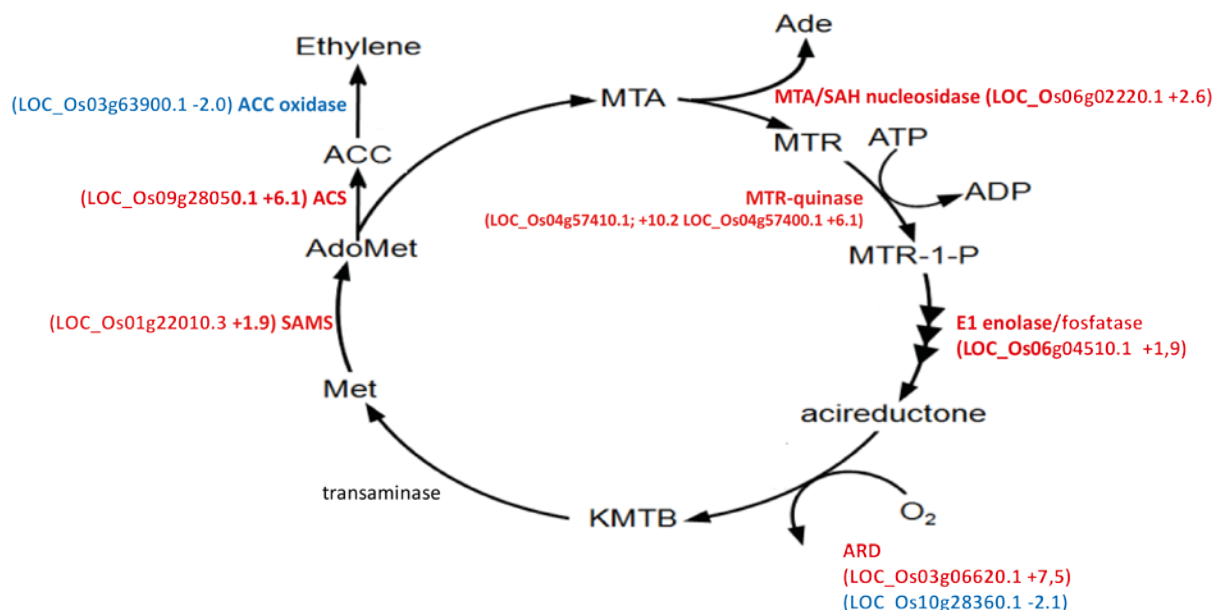
Estudos da enzima aci-redutona dioxigenase 1 (OsADR1) de arroz mostraram que na presença de baixas concentrações de etileno (etefon, molécula sintética que quando em contato com a planta é convertida a etileno) e do precursor de etileno a ACC, os níveis de expressão de OsADR1 é aumentado (SAUTER *et al.*, 2005). O transcriptoma de arroz inoculado com *H. seropedicae* apresentou o gene

da aci-redutona dioxigenase (LOC_Os03g06620.1) induzido 7,5 vezes. A comparação entre as sequências de LOC_Os03g06620.1 e a OsADR1 estudada por Sauter *et al.* (2005) mostrou que são similares com 83,95% de identidade (evalue= 3,3e-89).

Em contraste com os outros transcritos do ciclo de MTA o gene que codifica a enzima ACC oxidase, que catalisa a última reação da síntese de etileno, encontra-se reprimido 2 vezes em plantas inoculadas.

Esses resultados sugerem que a via de biossíntese de etileno pode estar reprimida pela presença de *H. seropedicae* enquanto a via do ciclo MTA está ativada. O ciclo MTA pode estar sendo desviado para a síntese de fitossideróforos, uma vez que Adomet, um sub produto do ciclo de MTA, é precursor da síntese de sideróforo. Como discutido no item anterior a via de síntese de fitossideróforo é induzida pela inoculação com a bactéria. Esses resultados estão em concordância com os dados obtidos por Alberton *et al.* (2013) que analisou o proteoma de raízes de arroz inoculadas com *H. seropedicae* após 7 dias. Além disso, Alberton mensurou os níveis de etileno nas plantas não inoculadas e inoculadas com *H. seropedicae* e observou uma diminuição nos níveis de etileno nas plantas inoculadas.

Portanto, a alteração da expressão de produtos gênicos envolvidos em ambas as vias de sinalização de etileno e auxina durante colonização suportam a hipótese de que a bactéria pode efetivamente influenciar o balanço hormonal da planta para superar o mecanismo de defesa da planta e assim permitir que ela possa colonizar tanto o interior e exterior da planta (VERHAGE; WEES; PIETERSE, 2010).



Metil-tioadenosina nucleosidase (MTA nucleosidase), 5-metil-tioribose quinase (MTR-quinase), aci-redutona dioxigenase (ARD), S-adenosilmetionina sintetase (SAMS), aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) e aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC-oxidase). Genes induzidos por *H. seropedicae* estão indicados em vermelho e os reprimidos em azul, seguido pelo valor da variação da expressão.

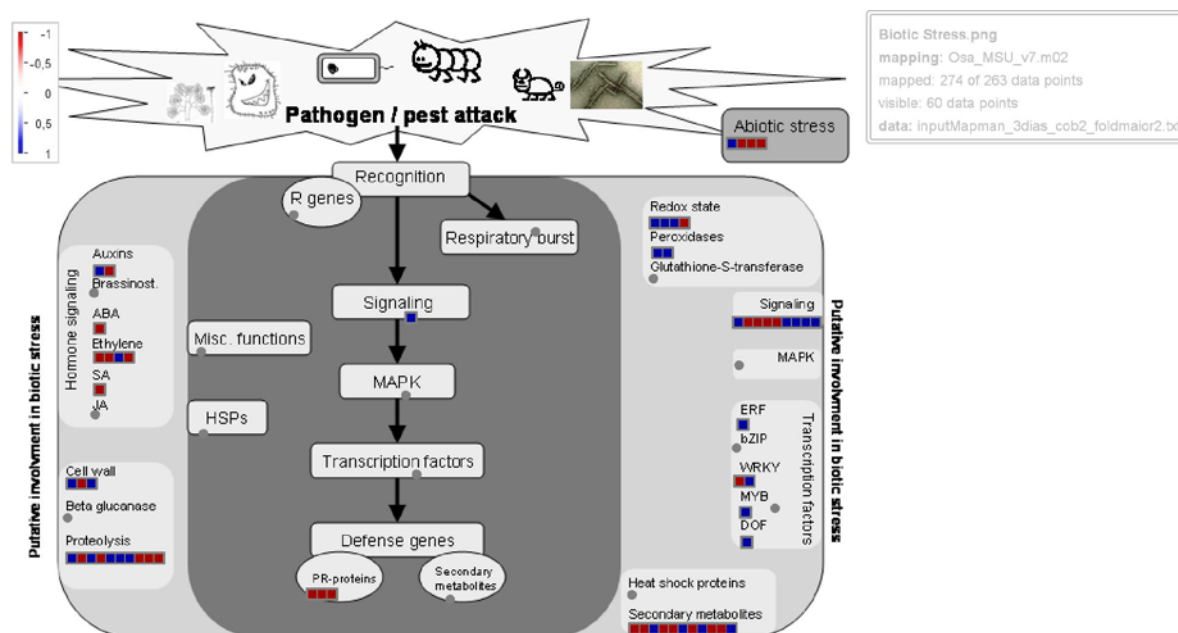
FIGURA 20 – GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENVOLVIDOS NO CICLO DE RECICLAGEM DE METIONINA E NA BIOSÍNTESE DE ETILENO

FONTE: Alberton *et al.* (2013) modificado

5.6.4 Genes relacionados ao estresse

Esta categoria, classificada pelo programa MapMan, inclui genes relacionados ao estresse biótico e abiótico. Os genes encontrados como diferencialmente expressos nessa categoria estão ilustrados na FIGURA 21. Para esta análise foi utilizado como arquivo de entrada o conjunto de genes diferencialmente expressos com diferença de expressão maior ou menor que duas vezes. Foram encontrados, na categoria de estresse biótico, 38 genes regulados (16 reprimidos e 22 induzidos). Entre estes, há genes relacionados: a sinalização por hormônios, de parede celular, proteólise, proteínas PR, de sinalização, de choque térmico, metabólitos secundários, fatores de transcrição, estado redox e peroxidases. Todos os genes encontrados nessa categoria estão descritos na tabela

10. Como algumas dessas subcategorias já foram descritas anteriormente, não serão discutidas novamente neste tópico.



Esta figura ilustra os genes regulados por *H. seropedicae* envolvidos na via de estresse biótico e abiótico. Este esquema foi construído utilizando o software MapMan e fornecido como entrada para o programa o conjunto de genes diferencialmente expressos com diferença de expressão maior ou menor que duas vezes. No campo cinza escuro estão representados os genes que possuem alguma indicação experimental como envolvidos nessa via. Enquanto no campo cinza claro estão os genes com função possível. Os genes induzidos estão em azul e os reprimidos em vermelho.

FIGURA 21: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS CATEGORIZADOS PELO MAPMAN COMO RELACIONADOS AO ESTRESSE BIÓTICO E ABIÓTICO
FONTE: A autora, utilizando programa MapMan (2013)

TABELA 10 – GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS RELACIONADOS A ESTRESSE BIÓTICO E ABIÓTICO

Gene ID	Sucategoria	Produto do gene/descrição	Varição de expressão	Valor- p	p-ajustado
LOC_Os01g16770.1	Parede celular	Similar a expansina A11(MSU)	2,6	0,0248	0,5274
LOC_Os04g44840.1	Parede celular	Possível proteína da família 3 de glicosil hidrolase, expressa (MSU); Similar a Beta-D-xilosidase. (RAPDB)	2,0	0,0014	0,1042
LOC_Os09g31270.1	Parede celular	Possível poligalacturonase, expressa (MSU)	-2,4	0,0069	0,2984
LOC_Os03g25300.1	Peroxidases	Possível precursor de peroxidase, expressa (MSU)	2,2	0,0006	0,0583
LOC_Os07g01410.1	Peroxidases	Possível precursor de peroxidase, expressa (MSU)	2,8	2,85E-05	0,0046
LOC_Os01g19260.1	Degradação de proteínas	Possível ATPase, expressa (MSU)	2,1	0,0019	0,1253

LOC_Os01g57082.1	Degradação de proteínas	Possível enzima que degrada insulina, expressa (MSU); Peptidase M16, proteína contendo sítio de domínio de ligação a zinco (RAPDB)	-2,4	0,0361	0,6109
LOC_Os04g03796.1	Degradação de proteínas	Possível OsSub37 – Homólogo a subtilisina, expressa (MSU); Peptidase S8, proteína contendo domínio relacionado a subtilisina (RAPDB)	-2,4	1,46E-12	6,991E-10
LOC_Os04g53620.1	Degradação de proteínas	Possível proteína da família ubiquitina, expressa (MSU)	2,8	3,21E-16	1,93E-13
LOC_Os05g28730.1	Degradação de proteínas	Proteína contendo domínio tipo C3HC4 e dedo de zinco, expressa (MSU); Similar a PIT1 (RAPDB)	-2,2	0,0115	0,3819
LOC_Os05g48340.1	Degradação de proteínas	Possível relacionada a proteasoma, expressa (MSU); Proteína contendo domínio duplo tipo armadillo (RAPDB)	-2,1	0,0018	0,1236
LOC_Os06g05990.1	Degradação de proteínas	Possível proteína da família dedo de zinco, expressa (MSU)	2,0	3,28E-05	0,0052
LOC_Os06g06600.1	Degradação de proteínas	OsFBX187 – proteína contendo domínio F-box, expressa (MSU)	-2,2	0,0052	0,2536
LOC_Os06g29310.1	Degradação de proteínas	Possível proteína da família ulp1 protease, expressa (MSU); Proteína da família Peptidase C48, SUMO/Sentrin/Ubl1 (RAPDB)	2,1	0,0098	0,3603
LOC_Os09g39070.1	Degradação de proteínas	Possível precursor de tiol protease SEN102, expressa (MSU)	2,1	0,0003	0,0342
LOC_Os01g16152.1	Redox	Possível peroxiredoxina, expressa (MSU)	-2,1	0,0149	0,4319
LOC_Os03g13160.1	Redox	Possível hemoglobina não simbiótica 2, expressa (MSU)	2,4	0,0009	0,0766
LOC_Os03g12510.1	Redox	Possível hemoglobina não simbiótica 2, expressa (MSU)	104,1	5,66E-24	5.223E-21
LOC_Os07g44440.1	Redox	Possível Peroxiredoxina, expressa (MSU)	3,7	2,32E-05	0.0040
LOC_Os09g22450.1	Sinalização	Possível lipase, expressa (MSU); Maior susceptibilidade a doença 1 (RAPDB)	2,0	0,0102	0,3621
LOC_Os02g01520.1	Sinalização	Proteína da família contendo motivo de ligação IQ calmodulina, possível, expressa (MSU)	2,2	0,0333	0,5979
LOC_Os02g30190.1	Sinalização	Proteína expressa (MSU)	2,0	0,0415	0,6434
LOC_Os03g19720.1	Sinalização	Possível proteína da família EF, expressa (MSU); Similar a proteína de ligação a Ca ²⁺ associada à reação hipersensitiva (RAPDB)	3,1	0,0343	0,6019
LOC_Os04g56430.1	Sinalização	Possível proteína quinase tipo receptora rico em cisteína, expressa (MSU)	3,2	6,89E-05	0.0010
LOC_Os05g47770.1	Sinalização	Possível proteína precursora At1g18390 quinase serine/threonine, expressa (MSU)	2,0	0,0101	0,3607
LOC_Os07g03790.1	Sinalização	Possível receptor tipo quinase 7 lectina, expressa (MSU)	-2,7	0,0091	0,3463

LOC_Os08g10320.1	Sinalização	Possível SHR5-receptor tipo quinase, expressa (MSU)	-2,5	2,37E-05	0.003997
LOC_Os01g67360.1	Estresse abiótico	Possível metiltransferase, expressa (MSU) Similar a proteínas da família resposiva a desidratação (RAPDB)	-2,9	0,0019	0,1253
LOC_Os06g29310.1	Estresse abiótico	Possível proteína da família ulp1 protease, expressa (MSU); Proteína da família Peptidase C48, SUMO/Sentrin/Ubl1 (RAPDB)	2,1	0,0098	0,3603
LOC_Os08g08960.1	Estresse abiótico	Proteína contendo domínio Cupin, expressa (MSU); Similar a proteína precursora Germin-like (RAPDB)	-2,7	3,66E-05	0.0056
LOC_Os08g13440.1	Estresse abiótico	Proteína contendo domínio Cupin, expressa (MSU); Proteína Germin-like 8-12, resistência à doença (RAPDB)	-5,3	0,0002	0,0259
LOC_Os11g02480.2	Regulação da transcrição	WRKY46, expressa (MSU)	-2,3	0,0482	0,6771
LOC_Os04g21950.1	Regulação da transcrição	WRKY51, expressa (MSU)	2,0	0,0149	0,4319
LOC_Os03g27090.1	Regulação da transcrição	Possível fator de transcrição da família MYB, expressa (MSU)	3,6	0,0006	0,0573
LOC_Os07g48570.1	Regulação da transcrição	Proteína expressa (MSU); Similar ao gene Dof3 (Fragmento) (RAPDB)	2,2	0,0048	0,2416
LOC_Os02g38392.1	Proteína-PR-	Possível proteína de resistência a doença NBS-LRR, expressa. (MSU)	-2,7	0,0003	0,0374
LOC_Os10g25870.1	Proteína-PR	Possível dirigente, expressa (MSU); Proteína da família de resposta a resistência a doença (RAPDB)	-2,5	0,0443	0,6569
LOC_Os11g07680.1	Proteína-PR	Possível dirigente, expressa (MSU); Proteína hipotética conservada (RAPDB)	-3,4	0,0044	0,2256

FONTE: A autora (2013)

NOTA: Na coluna contendo a descrição da proteína que o gene codifica estão descritos a anotação de ambos os bancos RAP-DB (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) e MSU (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>), quando ocorre diferença na descrição entre os bancos.

Após o ataque por patógeno uma das primeiras respostas observadas na planta é o estresse oxidativo. Este tipo de resposta inclui um rápido aumento no número de espécies reativas do oxigênio (ROS) (APOSTOL; HEINSTEIN; LOW, 1989). Em raízes de arroz inoculadas foram observados dois genes de peroxidases induzidos pela presença de *H. seropedicae*. Em plantas, peroxidases da classe III são induzidas em resposta a presença de patógenos e estão envolvidas em processos biológicos como metabolismo de ROS, formação de lignina e síntese de

fitoalexinas (ALMAGRO *et al.*, 2009; BINDSCHIEDLER *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis* a expressão reduzida da peroxidases PRX33 promoveu maior susceptibilidade a *Pseudomonas syringae* (DAUDI, *et al.* 2012). Isto também foi observado quando o gene de uma peroxidase da classe III (FBP1) foi deletado e as plantas de *Arabidopsis* eram sensíveis a estresse oxidativo e foram mais susceptíveis a patógenos fúngicos e bacterianos (BINDSCHIEDLER *et al.*, 2006). Em concordância com os dados obtidos, estudos de proteoma de raízes de arroz inoculadas com *H. seropedicae* exibiram indução de ascorbato peroxidase (ALBERTON *et al.*, 2013).

Em raízes de arroz inoculadas com *H. seropedicae* dois possíveis precursores de peroxidases foram induzidos (TABELA 10). Além da indução de três genes relacionados ao estado redox, duas hemoglobinas não simbióticas tipo 2 e uma peroxiredoxina. Sendo que uma destas hemoglobinas não simbióticas possui o maior valor de indução entre os genes regulados 104,1 vezes.

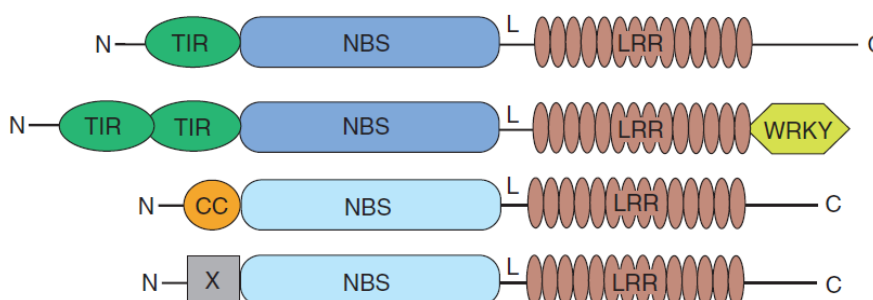
Hemoglobinas não simbióticas, como discutido no item 4.6.2, podem também estar envolvidas no metabolismo de oxigênio, contribuindo para diminuição do teor de oxigênio e assim providenciando ambiente mais favorável a atividade do complexo enzimático nitrogenase de *H. seropedicae*. Entretanto a função de hemoglobinas em plantas não está bem esclarecida.

Além das hemoglobinas, um gene de peroxirredoxina também se encontra induzida em plantas de arroz inoculadas. Peroxiredoxina é uma proteína também relacionada ao estado redox e é parte de um grupo de enzimas que decompõe H_2O_2 . Além disso, detoxifica hidroperóxido alquil e peroxinitrito (RHEE; CHAEB; KIM, 2005; DIETZ *et al.*, 2006).

Além do estresse oxidativo após o ataque por patógeno o sistema imune da planta pode responder ao ataque por patógenos. Esta resposta pode ocorrer de duas maneiras: primeiramente envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) através de receptores de reconhecimento desses padrões (PRRs) que estão na superfície celular. Este reconhecimento causa uma resposta imunológica chamada de “imunidade resultante do reconhecimento de padrões” (PTI). Posteriormente, proteínas de resistência (proteínas R) são expressas e reconhecem moléculas efetoras de patógenos e causam uma resposta imune causada por efetores (ETI) (ABRAMOVITCH; ANDERSON; MARTIN, 2006; McDOWELL; SIMON, 2008; JONES; DANGL, 2006).

Entre os genes regulados de arroz, envolvidos com o sistema imune da planta (mostradas no campo cinza escuro da FIGURA 21), foram encontrados 3 transcritos reprimidos e um induzido pela presença da bactéria. Os genes reprimidos codificam proteínas de resistência (LOC_Os02g38392.1, LOC_Os10g25870.1, LOC_Os11g07680.1 com variação de expressão de 2,7; 2,5 e 3,4, respectivamente) e o gene induzido codifica uma lipase chamada EDS1 (do inglês “*enhanced disease susceptibility 1*”, LOC_Os09g22450.1 induzida 2 vezes). Genes que codificam EDS1 quando mutados aumenta a susceptibilidade da planta a doenças.

O envolvimento de EDS1 no sistema de defesa via genes de resistência (R) está bem descrito em *Arabidopsis*. Genes de resistência codificam proteínas que contêm sítio de ligação a nucleotídeo e um sítio rico em repetições do aminoácido leucina, chamado de NBS-LRR (Figura 22) (AARTS *et al.*, 1998; BARTSCH *et al.*, 2006; JONES; DANGL, 2006; VENUGOPAL *et al.*, 2009; McHALE *et al.*, 2006).



Principais domínios das proteínas de resistência R: Domínio N-terminal pode conter TIR (domínio tipo receptor Toll/interleucina 1); CC (domínio coiled coil) e X (domínio sem motivo claro). NBS, corresponde a um motivo de ligação a nucleotídeo e LRR a um domínio rico em repetições de leucina.

FIGURA 22: PRINCIPAIS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA R

FONTE: McHale *et al.* (2006)

Plantas com o gene EDS1 mutado exibem aumento na susceptibilidade ao biotrófico oomiceto *Peronospora parasifica* (PARKER *et al.*, 1996), confirmando sua participação na resistência a doenças. Além disso, em *Arabidopsis* mutantes EDS1 a expressão de proteínas R não foi detectada. Entretanto, quando esses mutantes são tratados com ácido salicílico (SA) a expressão das proteínas R pode ser observada. Sendo assim, os autores sugerem que EDS1 tem função anterior a das proteínas R e da via de sinalização por ácido salicílico (FALK *et al.*, 1999).

O ácido salicílico é derivado de compostos fenólicos e está envolvido na resposta a ataque por patógenos (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009; AN; MOU, 2011). Em raízes de arroz inoculado com *H. seropedicae* foi observada uma repressão de 40 vezes do gene que codifica proteína da família carboxil metiltransferase dependente de SAM (LOC_Os11g15340.2). Um membro desta família de proteínas é a carboxi-metiltransferase do ácido salicílico (SAMT) que cataliza a formação de metil salicilato (MeSA) a partir do ácido salicílico (ROSS *et al.*, 1999). MeSA é um possível sinal essencial para a resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas de tabaco. Além disso, mutações em SAMT mostraram que esta enzima é necessária para SAR (PARK *et al.*, 2007). Aumento nos níveis de ácido salicílico e proteínas R após o aumento de EDS5 (outro gene que quando mutado aumenta susceptibilidade) ocorrem de maneira coordenada temporalmente (NAWRATH *et al.*, 2002). Entretanto Venugopal *et al.* (2009) analisou mutações simultâneas nos genes EDS1 e SID2 (que codifica isocorismato sintase) e observou deficiência na resposta hipersensitiva e/ou resistência mediada por genes R.

A via de sinalização por SA é diferencialmente regulada por membros da família de fatores de transcrição WRKY (EULGEM; SOMSSICH, 2007). Em raízes de arroz inoculado dois fatores de transcrição WRKY estão regulados, um reprimido (2,3 vezes) e outro induzido (2,0 vezes). O gene induzido codifica WRKY51 que é similar ao WRKY11 de *Arabidopsis*. WRKY11 é regulador negativo de resistência em planta (JOURNOT-CATALINO *et al.*, 2006). O gene reprimido codifica WRKY46. Este gene é induzido por ácido salicílico e quando é super expresso em *Arabidopsis*, esta se torna mais resistente ao patógeno *P. syringae* (HU; DONG; YU, 2012). Estes resultados estão de acordo com a hipótese, sugerida no presente trabalho, de que a via de sinalização por ácido salicílico e o sistema de defesa pode estar atenuado pela presença da bactéria.

Previamente foram identificados genes de arroz relacionados à defesa regulados por *H. seropedicae*. Entre eles estão genes que codificam proteína induzida por probenazol (PBZ1) e tioninas, que também se encontram regulada por *H. seropedicae* em bibliotecas de RNA-seq.

O gene pbz1 foi originalmente identificado por responder ao fungicida probenazol e levar a morte celular programada (KIM *et al.*, 2008). Análises por RT-qPCR (apresentado no item 4.1 de RESULTADOS) mostraram que a expressão desse gene é reprimida 3,6 vezes em plantas de arroz 7 dias após inoculação com

H. seropedicae (FIGURA 7). Este mesmo gene (LOC_Os12g36840.1) está reprimido 2,9 vezes nas bibliotecas de RNA-seq. Além deste, dois outros genes (LOC_Os12g36830.1 e LOC_Os12g36850.1) que codificam proteínas similares a PBZ1 também foram reprimidos (7,2 e 4,1, respectivamente). Interessantemente, análise de transcriptoma por RNA-seq em arroz inoculado com o fungo patógeno *Magnaporthe grisea* mostraram que um dos genes mais induzidos codificam proteínas similar a PBZ1 (LOC_Os12g36830 e LOC_Os12g36850) induzidos 273 e 233 vezes, respectivamente), (KAWAHARA *et al.*, 2012). Além disso, o gene PBZ1 é considerado um marcador molecular de arroz da resposta de defesa da planta (KIM *et al.*, 2008). A indução da expressão de genes por patógenos e a repressão em não patógenos poderia indicar que estes genes fazem parte de um sistema que reconhece o tipo de microrganismo com o qual a planta está em contato.

Outro gene relacionado à defesa regulado por *H. seropedicae* codifica tionina que é uma proteína pequena, rica em cisteína e ocorre em várias de espécies de planta (FLORACK; STIEKEMA, 1994). Essas proteínas são conhecidas por sua toxicidade contra patógenos em plantas e diversos estudos mostraram que sua superexpressão está relacionada ao aumento da resistência a doenças (CHOI *et al.*, 2008; IWAI *et al.*, 2002; MURAMOTO *et al.*, 2012).

As bibliotecas de EST e resultados de RT-qPCR mostraram que a expressão de tioninas do cromossomo 6 é reprimida por *H. seropedicae* (discutidas no item 4.1 de RESULTADOS). Entretanto o mapeamento das bibliotecas de RNA-seq 3 dias após a inoculação não revela sequências mapeadas nesses genes ou apresentam um número muito pequeno de sequências mapeadas, mas isso se deve a sequência muito similar entre as tioninas.

Segundo a anotação do banco *Rice Genome Annotation Project –MSU* o cromossomo 6 apresenta 15 loci que codifica tioninas e o cromossomo 7 possui 4. Uma vez que o mapeamento utilizado para a análise permite apenas o alinhamento de uma sequência em apenas um local no genoma, genes com sequências muito similares não terão sequências mapeadas. Assim, as tioninas do cromossomo 6 não foram detectadas no mapeamento realizado. Entretanto, quando as sequências não mapeadas são alinhadas contra a sequência das tioninas separadamente o padrão de regulação de repressão é também confirmado em nossos dados de RNA-seq, com uma média de 480 sequências alinhadas na biblioteca controle e 135 na inoculada (TABELA 11).

TABELA 11 – NÚMERO DE SEQUÊNCIAS MAPEADAS EM GENES QUE CODIFICAM TIONINAS

Número de sequências	LOC_Os06g32020	LOC_Os06g31930	LOC_Os06g31960	LOC_Os06g32160
CR3aRun1	168	170	170	160
CR3aRun2	519	518	518	486
CR3bRun1	305	304	304	284
CR3bRun2	955	957	957	913
Média	486	487	487	461
IR3aRun1	109	110	110	102
IR3aRun2	235	237	237	226
IR3bRun1	67	65	65	64
Média	137	137	137	131

Resultado de mapeamento das bibliotecas construídas a partir das amostras de raízes de arroz não inoculadas (C) e inoculadas (I) com *H. seropedicae* 3 dias após a inoculação, construídas em duplicata biológica (a e b). Dessa forma as amostras foram nomeadas de CR3a e CR3b (amostras não inoculadas, 3 dias após inoculação); IR3a e IR3b (amostras inoculadas, 3 dias após inoculação). O número de sequências alinhadas é resultado do mapeamento do conjunto de sequências não mapeadas para cada amostra contra a sequência de cada gene separadamente. Os parâmetros de mapeamento foram os mesmos utilizados nas outras análises.

FONTE: A autora (2013)

Diferente das tioninas do cromossomo 6 uma das tioninas do cromossomo 7 foi observada no mapeamento realizado. Esta tionina do cromossomo 7 (LOC_Os07g24830.1) apresentou uma indução de 7,2 vezes na presença de *H. seropedicae*, 3 dias após a inoculação. Sendo assim, podemos sugerir que nem todas as tioninas estão reprimidas pela presença da bactéria, o que também pode estar contribuindo para o controle do crescimento das bactérias no interior da planta.

Um mecanismo de infecção que pode ser utilizado por bactérias é a utilização de enzimas, que degradam a parede celular da planta, facilitando sua entrada no hospedeiro. Diversos microrganismos que se associam endofiticamente ou epifiticamente como *H. seropedicae* Z67, *H. rubrisubalbicans* e *Azospirillum brasilense* e fitopatógenos como *Magnaporthe oryzae* produzem enzimas que degradam a parede celular vegetal (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980, JAMES *et al.*, 2002 MEHDIPOUR-MOGHADDAM *et al.*, 2010; KAWAHARA *et al.*, 2012). Interessantemente, o genoma de *H. seropedicae* SmR1 não apresenta nenhum gene que codifica celulasas, pectinases ou outras enzimas que degradam a parede

celular (PEDROSA *et al.*, 2011). Entretanto, entre os genes regulados por *H. seropedicae* em plantas de arroz observou-se três genes envolvidos no metabolismo da parede celular. Dois destes codificam β -D-xilosidase e a enzima poligacturonase, induzido 2,0 e reprimido 2,4 vezes, respectivamente.

Em *Arabidopsis thaliana* β -D-xilosidase está envolvida no metabolismo da hemicelulose da parede secundária e no desenvolvimento da planta (GOUJON *et al.*, 2003). Poligalacturonase é uma enzima que hidrolisa pectina, é descrita como um fator de virulência em plantas (RODRIGUEZ-PALENZUELA; BURR; COLLMER, 1991; HUANG; ALLEN, 2000) e proteínas que inibem sua atividade parecem estar envolvidas no sistema imune de plantas pois favorecem o acúmulo de elicitor e ativa o sistema de defesa (FEDERICI *et al.*, 2006).

Outro gene, também regulado envolvido no metabolismo da parede celular, codifica uma proteína similar a expansina11 e está induzido 2,6 vezes em plantas inoculadas com *H. seropedicae*. Expansinas produzem um afrouxamento da parede celular e tem como função o alongamento celular e participam em diversos processos de desenvolvimento, nos quais a modificação da parede celular ocorre. Sua atividade é dependente do pH e seu pH ótimo é na faixa ácida (SAMPEDRO; COSGROVE, 2005). Além disso, expansinas promovem o alongamento de raízes (ZHIMING *et al.*, 2011; LIN; CHOI; CHO, 2011) e início do crescimento de raízes (KWASNIEWSKI; SZAREJKO, 2006).

As expansinas são também correlacionadas com a interação planta-bactéria. Em tabaco *Bacillus subtilis* G1, uma bactéria promotora do crescimento em plantas, induz a expressão de duas expansinas NTEXP2 e NTEXP6 (WANG *et al.*, 2009). Os autores sugerem que esta indução poderia estar contribuindo para o incremento no crescimento de plantas de tabaco observado quando da inoculação com esta bactéria (WANG *et al.*, 2009). Além disso, deleção do gene *yoaJ* que codifica uma expansina bacteriana (EXLX1) de *Bacillus subtilis* promoveu redução da colonização em raízes de milho (KERFF *et al.*, 2008). Em concordância com esses dados, após a inoculação de *Melilotus alba* com *Sinorhizobium meliloti* induziu a expressão do RNAm MAEXP1 que codifica uma expansina (GIORDANO; HIRSCH, 2004).

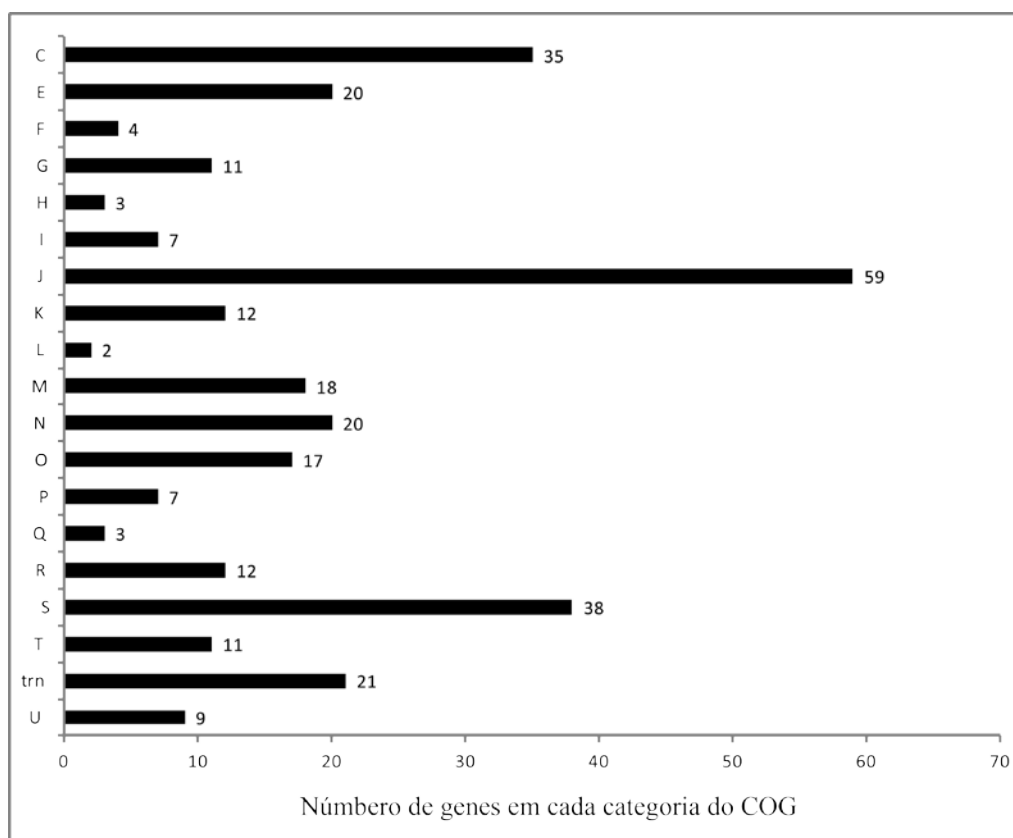
Outro gene codifica uma proteína receptora associada a membrana tipo quinase 22 e está entre os com maior variação de expressão entre os genes de arroz diferencialmente expressos por *H. seropedicae*. Este gene encontra-se reprimido 93,1 vezes em raízes inoculadas. Apesar dessa proteína não estar entre

os genes com função caracterizada na análise com o programa MapMan, em *Arabidopsis thaliana* foi observado que a expressão de uma proteína tipo quinase 10 associada a membrana funciona como uma guanilil ciclase e é co-expressa com genes relacionados a defesa (MEIER *et al.*, 2010). Este dado sugere que a proteína associada a membrana tipo quinase 22 poderia ser um sinalizador do sistema de defesa da planta e portanto sua repressão pode ser importante para uma interação harmônica *H. seropedicae*-arroz.

Entre os genes com provável envolvimento na sinalização do estresse biótico encontramos 6 genes induzidos e 2 reprimidos (TABELA 10). Entre eles um gene que codifica para receptor-quinase SHR5 está reprimido 2,5 vezes. A proteína codificada por este gene possui 74% de identidade com o receptor quinase SHR5 de cana-de-açúcar reprimido em plantas colonizadas com os endófitos diazotróficos *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL5), *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC54), *H. seropedicae nif* (estirpe M2), *H. rubrisubalbicans* (estirpe HCC103), e *Azospirillum brasilense* (estirpe Sp245). Os resultados da análise da expressão gênica desta proteína revelou que os níveis de expressão estão inversamente relacionados com a eficiência da interação benéfica planta-bactéria. Isto é, em interações benéficas planta-bactéria a expressão deste gene é reprimida enquanto em interações planta-patógeno não é regulada (VINAGRE *et al.*, 2006).

5.7 ANÁLISE DE GENES DE *H. seropedicae* EXPRESSOS NAS BIBLIOTECAS DE RAÍZES DE ARROZ INOCULADAS

As sequências das bibliotecas inoculadas com *H. seropedicae* e que não mapearam no genoma de arroz, foram alinhadas contra o genoma desta bactéria. O mapeamento produziu um total de 24.278 sequências alinhadas unicamente no genoma de *H. seropedicae*. Entre os 4085 genes anotados de *H. seropedicae* SmR1 287 foram identificados com uma vez de cobertura ou mais. A classificação funcional desses genes foi feita utilizando o banco de dados COG (TATUSOV *et al.*, 2003) e está mostrada na FIGURA 23.



A classificação funcional foi realizada de acordo com banco de dados COG. As classes estão representadas com letras: C, Conversão e produção de energia; E, Metabolismo e transporte de aminoácido; F, Metabolismo e transporte de nucleotídeos; G, Metabolismo e transporte de carboidratos; H, Metabolismo e transporte de coenzima; I, Metabolismo e transporte de lipídeos; J, Tradução, Biogênese e estrutura ribossomal; M, Parede celular; N, motilidade celular; O, Modificação pós traducional, dobramento proteico e chaperonas; P, Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; Q, Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo; R, Possível função geral; S, Função desconhecida; T, Mecanismo de tradução de sinal; trn, RNA transportador; U, Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular.

FIGURA 23 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DETECTADOS DE *H. seropedicae* EM RAÍZES DE ARROZ INOCULADAS

FONTE: A autora (2013)

A classe com maior representatividade é a de genes envolvidos na estrutura e tradução de ribossomos seguida de genes de função desconhecida, produção e conversão de energia, metabolismo e transporte de aminoácidos, motilidade celular e síntese de parede celular.

Na categoria “metabolismo e transporte de aminoácidos” os genes mais expressos foram *trpB* (transportador de triptofano), *Hsero_3857* (transportador

periplasmático ABC de aspartato/glutamato) e *glnK* (proteína pII regulatória da fixação de nitrogênio) que apresentaram valores de cobertura de 9,8, 6,5 e 6,4 e RPKM de 80,8, 7721,4, 6742,7 respectivamente. O aminoácido triptofano pode estar sendo utilizado para a biossíntese de auxina e assim seu elevado nível de expressão em raízes de arroz indica que esta via está ativa.

Além da *glnK* outros genes relacionados a fixação de nitrogênio também foram detectados na amostra inoculada. Genes *nif* codificam proteínas que são essenciais para a biossíntese, maturação e montagem do complexo da nitrogenase (CHUBATSU *et al.*, 2012). Este complexo enzimático utiliza o gás nitrogênio atmosférico para fixar nitrogênio. Em plantas inoculadas foi observado a expressão dos genes *nifD* e *nifH*. Além disso, os genes de *fdxA* e *fdxN* duas ferredoxinas importantes para a atividade da nitrogenase foram detectadas (SOUZA *et al.*, 2010). Os promotores dos genes *nif* são ativados por *NifA* que é regulado pelo sistema Ntr. Em *H. seropedicae* o sistema Ntr é composto por *glnD* (codifica uma uridililtransferase), *glnB* e *glnK* (codificam proteínas sinais de transdução da família PII), *amtB* (transportador de amônio putativo), *glnA* (codifica uma glutamina sintetase), *glnE* (codifica uma adenililtransferase), *ntrB* e *ntrC* (codificam dois componentes do sistema regulatório) (CHUBATSU *et al.*, 2012). Entre os genes de *H. seropedicae* expressos foram observados *glnA*, *glnK* e *amtB* com uma cobertura de 4,1, 6,4 e 4,3 vezes respectivamente. Outros genes potencialmente relacionados a fixação biológica de nitrogênio são os genes *fixN* e *fixP* e um transportador de ureia do tipo ABC (*Hsero_4713*) com uma cobertura de 3,8 vezes. Esses resultados sugerem que *H. seropedicae* está fixando nitrogênio durante a interação com raízes de arroz.

Na categoria de motilidade celular foram encontrados 4 genes com uma cobertura de pelo menos 2 vezes. Entre eles *cheW* (um regulador positivo da atividade da proteína CheA), *flhD*, *fliC* e *pilZ* de montagem do pilus tipo IV (*Hsero_2062*). O pilus tipo IV é um filamento extremamente forte e flexível e está envolvido na adesão e colonização da bactéria em células hospedeiras e são fatores de virulência em bactérias patogênicas (CRAIG; PIQUE; TAINER, 2004). Em *Azoarcus* sp., uma bactéria endofítica diazotrófica, o gene *pilA* é essencial para a formação do pilus tipo IV e sua mutação afeta a colonização em raízes de arroz (DÖRR; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1998). Isso sugere que pilus tipo IV é

importante não somente para a interação planta-patógeno como em interações benéficas.

Entre os 19 genes expressos de *H. seropedicae* relacionados a parede celular, 7 apresentaram pelo menos 2 vezes de cobertura. Entre os genes com maior número de seqüências observou-se dois de porinas da membrana externa *Hsero_4295* e *ompC* com 27,9 e 3,9 vezes de cobertura, respectivamente. Além disso, foi observado um gene codificando uma proteína sinal (*Hsero_3696*) com 8,4 vezes de cobertura e uma proteína de membrana (*Hsero_0083*) de função desconhecida. Este conjunto de genes está potencialmente envolvido na interação da bactéria com a planta e podem ser objeto de estudos para identificação de componentes importantes no reconhecimento da bactéria pela planta.

6 CONCLUSÕES

- *H. seropedicae* coloniza a superfície e o interior de raízes de arroz alcançando média de $4,4 \cdot 10^8$ UFC/g de raiz e $4,2 \cdot 10^5$ UFC/g de raiz, respectivamente, após 1, 3 e 7 dias da inoculação;
- A massa seca e tamanho de raízes de plântulas inoculadas e não inoculadas não foram significativamente diferentes 14 dias após inoculação;
- Bibliotecas de RNA-seq 3 dias após inoculação geraram um total de 103,5 milhões de leituras de sequências. 18,2% dessas sequências mapearam em uma única região do genoma de arroz, representando 13.838 transcritos expressos;
- A análise de expressão diferencial revelou 1019 genes diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$. Entre estes, 256 apresentaram variação de expressão maior ou menor que duas vezes (*fold-change* >2 ou <2);
- O conjunto de genes diferencialmente expressos foi classificado funcionalmente pelo programa pelo MapMan. As categorias funcionais com maior número de genes foram: metabólitos secundários, metabolismo de metais, metabolismo de fito-hormônios e estresse biótico;
- Na categoria de metabólitos secundários as vias com maior número de genes regulados foi a via de biossíntese de flavonóides e a biossíntese de isoprenóides. Todos os genes encontrados dessas vias foram reprimidos pela presença de *H. seropedicae*;
- Entre os 20 genes diferencialmente expressos com variação de expressão maior ou menor que 10 vezes, 8 deles estão envolvidos com metabolismo de íons metálicos. Nesta categoria foram encontramos 11 genes induzidos por *H. seropedicae*. Estes genes codificam proteínas relacionados à biossíntese de fitossideróforos (PS) e transportadores de fitossideróforos e complexos FeIII-PS. Os resultados indicam um aumento no transporte de Fe para a planta em condição de inoculação com *H. seropedicae*;
- A inoculação com *H. seropedicae* induz mudança na expressão de genes envolvidos na via de sinalização por auxina e etileno. Na via de auxina 6 genes foram reprimidos (LOC_Os08g24790.1, LOC_Os09g25770.1, LOC_Os05g01570.1, LOC_Os01g70270.1, LOC_Os02g13520.1, LOC_Os05g48590.1, reprimido 2,1 1,8 2,5 1,5 2,8 e 1,6 vezes,

respectivamente) e 2 induzidos (LOC_Os01g67030.1, LOC_Os01g63770.1 induzidos 2,5 e 1,5, respectivamente). Na via do etileno, o gene ACC oxidase foi reprimido 2 vezes;

- Vários genes relacionados a defesa da planta foram reprimidos por *H. seropedicae*. Entre estes, genes que codificam proteínas R de resistência, tioninas, ISAP1 e PBZ1.
- Genes de proteínas envolvidas no metabolismo da parede celular foram induzidos, o que pode ser um fator facilitador da entrada da bactéria na planta e/ou de promoção do crescimento de raízes;
- Alguns genes de *H. seropedicae* também foram detectados em raízes de arroz inoculadas com *H. seropedicae*. Entre os mais abundantes estão: genes que codificam proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio, de membrana e parede celular, transporte de aminoácidos e motilidade celular;

7 REFERÊNCIAS

- AARTS, N. *et al.* Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 10306–10311, 1998.
- ABRAMOVITCH, R.B.; ANDERSON, J.C.; MARTIN, G.B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nature reviews - molecular cell biology**, v.7, p. 601 – 61, 2006.
- ALBERTON, D. *et al.* Comparative proteomics analysis of the rice roots colonized by *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 reveals induction of the methionine recycling in the plant host. **Journal of Proteome Research**, 2013.
- ALBERS, E. Metabolic Characteristics and Importance of the Universal Methionine Salvage Pathway Recycling Methionine from 5'-Methylthioadenosine. **Life**, v. 61, p. 1132–1142, 2009.
- ALMAGRO, L. *et al.* Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 377–390, 2009.
- AMIR, R. Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. **Amino Acids**, v. 39, p. 917–931, 2010.
- ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, p. R106, 2010.
- AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p. 412–428, 2011.
- ARANGARASAN, V.; PALANIAPPAN, S.P.; CHELLIAH, S., Inoculation effects of diazotrops and phosphobacteria on rice. **Indian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 111–112, 1998.
- ARENCIBIA, A.D. *et al.* A *Gluconacetobacter diazotrophicus* Elicits a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling & Behavior**, v.1, p. 265-273, 2006.
- ARREDONDO-PETER, R. *et al.* Rice hemoglobins. Gene cloning, analysis, and O₂-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1259–1266, 1997.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Itaguaí, RJ, 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN L.; DÖBEREINER J: Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **Int J Syst Bacteriol**, v. 36, p. 86–93, 1986.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485–491, 2000.

BALSANELLI, E. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 2233–2244, 2010.

BARRAQUIO, W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v. 194, p. 15-24, 1997.

BARTSCH, M. *et al.* Salicylic Acid–Independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Signaling in *Arabidopsis* Immunity and Cell Death Is Regulated by the Monooxygenase FMO1 and the Nudix Hydrolase NUDT7 W. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1038–1051, 2006.

BASHIR, K. *et al.* Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 32395–32402, 2006.

BASTIAN, F.*et al.* Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7–11, 1998.

BENSON, D.A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D25–D30, 2008.

BINDSCHEDLER, L.V. *et al.* Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. **The Plant Journal**, v. 47, p. 851–863, 2006.

BLEECKER, A.B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in Plants. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** V. 16, p.1–18, 2000.

BRUSAMARELLO, L.C.C. **Sequenciamento e análise de sequências expressas (ESTs) de arroz (*Oryza sativa*) inoculado com *Herbaspirillum seropedicae***. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BODDEY, R.M. *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BOHLMANN, H. *et al.* Leaf-thionins of barley: a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. **The EMBO Journal**, v. 7, p.1559–1565,1988.

BURESH, R.J. **Nutrient best management practices for rice, maize, and wheat in Asia**. Brisbane, Australia, p. 164–167, 2010.

CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; et al. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 62-64, 2003.

CAVALCANTE, J.J.V. et al. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 673–686, 2007.

CHEN, J. et al. A comparison of microarray and MPSS technology platforms for expression analysis of *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v. 8, 2007.

CHEN, F. et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v. 66, p. 212–229, 2011.

CHEONG, Y.H. et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 129, p. 661–677, 2002.

CHI, F. et al. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. **Proteomics**, v.10, p. 1861-74, 2010.

CHOI, Y.; CHOI, Y.D.; LEE, J.S. Antimicrobial activity of c-thionin-like soybean SE60 in *E. coli* and tobacco plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, p. 230–234, 2008.

CHOUDHURY, A.T.M.A., KENNEDY, I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biol. Fertil. Soils**. v.39, p. 219-227, 2004.

CHUBATSU, L.S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, v. 356, p. 197-207, 2012.

CIARDI, J.A. et al. Response to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. **Plant Physiology**, v. 123, p.81–92, 2000.

CRAIG, L. ;PIQUE, M.E.; TAINER, J.A. Type iv pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature reviews Microbiolog*, v. 2, p. 363 – 378, 2004.

CURIE, C. et al. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**, v. 409, p. 346–349, 2001.

DAUDI, A. et al. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. **Plant Cell**, v. 24, p. 275–287, 2012.

DEAKIN, W.J.; BROUGHTON, W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 312–320, 2009.

DIETZ, K.-J.; *et al.* The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1697–1709, 2006.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA, 1995.

DÖRR, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 7–17, 1998.

ELBELTAGY, A. *et al.* Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, 2001.

ENGKILDE, K.; JACOBSEN S.; SØNDERGAARD, I. Multivariate Data Analysis of Proteome Data. **Plant Proteomics, Methods in Molecular Biology**, v. 355, p. 195–210, 2007.

EULGEM, T.; SOMSSICH, I.E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 366–371, 2007.

FALK, A. *et al.* EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 3292–3297, 1999.

FEDERICI, L. *et al.* Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? **TRENDS in Plant Science**, v.11, n. 2, 2006.

FERRER J.L. *et al.* Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 356–370, 2008.

FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.

FLORACK, D.E.A.; STIEKEMA, W.J. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 25–37, 1994.

FUENTES-RAMIREZ, L.E. *et al.* *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145–150, 1993.

GIORDANO, W.; HIRSCH, A.M. The Expression of MaEXP1, a *Melilotus alba* Expansin Gene, Is Upregulated During the Sweetclover–*Sinorhizobium meliloti* Interaction. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 17, p. 613–622, 2004.

GLAZEBOOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205–227, 2005.

GLICK, B.R. *et al.* Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 329–339, 2007.

GYANESHWAR, P. *et al.* *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium - tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, p. 131–145, 2002.

GOFF, S.A. *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, p. 92–100, 2002.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**, v. 5, p. 1003–1011, 2000.

GOTTLIEB, D.M.; SCHULTZ, J.; BRUUN, S.W.; *et al.* Multivariate approaches in plant science. **Phytochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1531–1548, 2004.

GOUJON, T. *et al.* AtBXL1, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development. **The Plant Journal**, v. 33, p. 677–690, 2003.

GUTTERSON, N.; REUBER, T.L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 465–471, 2004.

HAKOYAMA, T. *et al.* Nicotianamine synthase specifically expressed in root nodules of *Lotus japonicus*. **Planta**, v. 230, p. 309–317, 2009.

HANNAH, M.A.; HEYER, A.G.; HINCHA, D.K. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 1, p. 179–196, 2005.

HASSAN, S.; MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3429–3444, 2012.

HERVÉ, P.; KAYANO, T. Japonica rice varieties (*Oryza sativa*, Nipponbare, and others). **Methods in Molecular Biology**, v. 343, p. 213–222, 2006.

HIGUCHI, K. *et al.* Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytoalexins. **Plant Physiology**, v. 119, p. 471–480 1999.

HINDT, M.N.; GUERINOT, M.L. Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, p. 1521–1530, 2012.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, California, circular 347, 1950.

HOFIUS, D. *et al.* Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for Potato virus Y infection in tobacco plants. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11870–11880, 2007.

HOFFMAN, T. *et al.* Isolation of Ethylene-Insensitive Soybean Mutants That Are Altered in Pathogen Susceptibility and Gene-for-Gene Disease Resistance. **Plant Physiol.** v. 119, p. 935–949, 1999.

HOLZSCHUH, M.J. *et al.* Resposta do arroz irrigado ao suprimento de amônio e nitrato. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 33, p.1323-1331, 2009.

HONG, S.W. *et al.* Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 113, p. 1203–1212, 1997.

HU, Y.; DONG, Q.; YU, D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v. 185-186, p. 288–297, 2012.

HUANG, Q.; CAITILYN, A. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 77-83, 2000.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868–877, 1999.

INOUE, H. *et al.* Identification and localisation of the rice nicotianamine aminotransferase gene OsNAAT1 expression suggests the site of phytosiderophore synthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 193–203, 2008.

INOUE, H. *et al.* Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 3470–3479, 2009.

INUKAI, Y. *et al.* Crown rootless1, Which Is Essential for Crown Root Formation in Rice, Is a Target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in Auxin Signaling. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1387–1396, 2005.

ISHIMARU, Y. *et al.* Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. **The Plant Journal**, v. 45, p. 335–346, 2006.

ISHIMARU, Y. *et al.* Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. **The Plant Journal**, v. 62, p. 379–390, 2010.

ITOH, T. *et al.* Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. japonica and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. **Genome Research**, v. 17, p. 175–183, 2007.

IWAI, T. *et al.* Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 15, p. 515–521, 2002.

JAIN, M. *et al.* Structure and expression analysis of early auxinresponsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). **Functional & Integrative Genomics**, v. 6, p. 47–59, 2006a.

JAIN, M. *et al.* Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646–651, 2006b.

JAIN, M.; KHURANA, J.P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 3148–3162, 2009.

JAMES, E.K. *et al.* Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 15, n. 9, p. 894–906, 2002.

JAMESON, P. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. **Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 369–380, (2000).

JIN, S. *et al.* A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1749–1753, 2006.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323–329, 2006.

JOURNOT-CATALINO N, *et al.* The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 18, p. 3289–3302, 2006.

KAKEI, Y. *et al.* OsYSL16 plays a role in the allocation of iron. **Plant Molecular Biology**, v. 79, p. 583–594, 2012.

KAWAHARA, Y. *et al.* Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. **PLoS ONE**, v. 7, p. e49423, 2012.

KAWAHARA, Y. *et al.* Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, v. 6, 2013.

KAWASAKI, T. *et al.* Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. **PNAS**, v. 103, n. 1 p. 230–235, 2006.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1229–1244, 2004.

KERFF, F. *et al.* Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. **PNAS**, v. 105, p. 16876–16881, 2008.

KIM, S.; AHN, I.P.L.; LEE, Y.H. Analysis of genes expressed during rice–*Magnaporthe grisea* interactions. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 14, p. 1340–1346, 2001.

KIM, S.T. *et al.* Proteomics analysis of rice lesion mimic mutant (spl1) reveals tightly localized probenazole-induced protein (PBZ1) in cells undergoing programmed cell death. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 1750–1760, 2008.

KWASNIEWSKI, M.; SZAREJKO, I. Molecular Cloning and Characterization of b-Expansin Gene Related to Root Hair Formation in Barley. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1149–1158, 2006.

LADHA, J.K.; REDDY, P.M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. *Plant and Soil*, v. 252, p. 151–167, 2003.

LAUVERGEAT, V. *et al.* Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1187–1195, 2001.

LEE, S. *et al.* Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. **PNAS**, v. 106, p. 22014–22019, 2009.

LI, L. *et al.* Global identification and characterization of transcriptionally active regions in the rice genome. **PLoS One**, v.2, n.3, 2007.

LI, M.; XU, Z. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 640–644, 2008.

LIRA-RUAN V. *et al.* Synthesis of hemoglobins in rice (*Oryza sativa* var. Jackson) plants growing in normal and stress conditions. **Plant Science**, v. 161, p. 279–287, 2001.

LIN, C.; CHOI, H-S., CHO, H-T. Root Hair-Specific EXPANSIN A7 Is Required for Root Hair Elongation in *Arabidopsis*. **Molecules and Cells**, v. 31, p. 393–397, 2011.

LINDER, P.; OWTTRIM, G.W. Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 344–352, 2009.

LING, H.Q. *et al.* Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. **Molecular and General Genetics**, v. 252, p. 87–92, 1996.

LIVAK, J.K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v.25, p. 402–408, 2001.

Real- Time Quantitative PCR and the 2CT Method. **METHODS** 25, p. 402–408.

LOHSE, M. *et al.* RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. W622–W627, 2012.

LORBIECKE, R.; SAUTE, M. Adventitious Root Growth and Cell-Cycle Induction in Deepwater Rice. **Plant Physiology**, v. 119, p. 21–29, 1999.

LU, L. *et al.* Pc4, a putative movement protein of Rice stripe virus, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. **Virus Genes**, v. 38, p. 320–327, 2009.

LUCAS, M. An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 3, p. e3673, 2008.

MACHADO, H.B. *et al.* Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 549-553, 1991.

MALAMY, J. E.; BENFEY P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 124, p. 33-44, 1997.

MALARVIZHI, P.; LADHA, J.K. Influence of available nitrogen and rice genotype on associative nitrogen fixation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 63 p. 93-99, 1999.

McHALE, L. *et al.* Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biology**, v. 7, p. 212, 2006.

MEHDIPOUR-MOGHADDAM, M.J. *et al.* Novel phytase and cellulase activities in endophytic *Azospirilla*. **World Applied Sciences Journal**, v. 10, p.1129–1135, 2010.

MEIER, S.; *et al.* The *Arabidopsis* wall associated kinase-like 10 gene encodes a functional guanylyl cyclase and is co-expressed with pathogen defense related genes. **PLoS ONE**, v. 5, p. e8904, 2010.

McDOWELL J.M.; DANGL J.L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Science**, v. 25, n. 2, p. 79-82, 2000.

McDOWELL, J.M.; SIMON S.A. Molecular diversity at the plant–pathogen interface. **Developmental and Comparative Immunology**, v.32, p. 736–744, 2008.

MIZUNO, H. *et al.* Massive parallel sequencing of mRNA in identification of unannotated salinity stress-inducible transcripts in rice (*Oryza sativa* L.) **Genomics**, v. 11, p. 683, 2010.

MONTEIRO, R.A. *et al.* *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, p. 175-196, 2012.

MORGAN, P.; HALL, W. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. **Physiology Plant**, v. 15, p. 420–427, 1962.

van de MORTEL, *et al.* Distinct biphasic mRNA changes in response to Asian soybean rust infection. **Molecular Plant–Microbe Interaction**, v. 20, p. 887–899, 2007.

MUDAY, G.K.; RAHMAN, A.; BINDER, B.M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 181–195, 2012.

MUKHOPADHYAY, A.; VIJ, S.; TYAGI, A.K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. **PNAS**, v. 101, p. 6309–6314, 2004.

MUTHUKUMARASAMY R. *et al.* Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biol Fertil Soils**, v. 29, p. 157–164, 1999.

NAOUMKINA, M.A. *et al.* Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 6, p. 829–846, 2010.

NAVARRO, L. *et al.* A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, v. 312, p. 436–439, 2006.

NAWRATH, C. *et al.* EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. **Plant Cell**, v. 14, p. 275–286, 2002.

NOBUTA, K. *et al.* An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 4, 2007.

NOBUTA, K.; VEMARAJU, K.; MEYERS, B.C. Methods for analysis of gene expression in plants using MPSS. **Methods in Molecular Biology**, v. 406, p. 387-408, 2007.

NOGUEIRA, E.M. *et al.* Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 199-206, 2001.

NOZOYE, T. *et al.* Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. **The journal of biological chemistry**, v. 286, p. 5446–5454, 2011.

OKADA, A. *et al.* Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 65, p. 177–187, 2007.

OLIVARES, F.L.; JAMES, K. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in sugar cane plants. Em PEDROSA *et al.* F.O. **Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity**, 413–414, 2000.

OLIVARES, F.L. *et al.* Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.03, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L. *et al.* Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.** 135, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M. *et al.* The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205–215, 2002.

OTT, T. *et al.* Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Current Biology**, v. 15, p. 531–535, 2005.

PACHECO, F. Sequenciamento, identificação e análise de genes de arroz envolvidos na interação com *Herbaspirillum seropedicae*. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PARK, S-W. *et al.* Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, p. 113–116, 2007.

PARKER, J.E. *et al.* Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. **Plant Cell**, v. 8, p. 2033–2046, 1996.

PEDROSA, F.O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, p. e1002064, 2011.

PEREIRA, J.A.R. *et al.* Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v.110, p. 269–274, 1988.

PÉRET, B. *et al.* *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 399-408, 2009.

PIMENTEL, J.P. *et al.* Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

PLAPER A. *et al.* Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, p. 530–536, 2003.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge, Cambridge Univ.Press, 1982.

PUHLER, A. *et al.* What can bacterial genome research teach us about bacteria–plant interactions? **Current Opinion in Plant Biology**, v., 7, p. 137–147, 2004.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, A. T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 139–144, 1998.

REIS V.M. *et al.* Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v.19, n.3, p. 227–247, 2000.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1543–1552, 2005.

ROBERT-SEILANIAN, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **The Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 317–343, 2011.

RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; BURR, T.J.; COLLMER, A. Polygalacturonase is a Virulence Factor in *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 3. **Journal of bacteriology**, v. 173, p. 6547–6552, 1991.

ROGER, P.A.; LADHA, J.K. Biological N₂ fixation in wetland rice fields: estimations and contribution to nitrogen balance. **Plant and Soil**, v. 141, p. 41–55, 1992.

ROGG, L.E.; BARTEL, B. Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. **Developmental cell**, v. 01, p. 595–604, 2001.

RONCATO-MACCARI, L.D.B. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39–47, 2003.

ROCHA, F.R. *et al.* Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 8, 2007

ROSS, J.R. *et al.* S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, p. 9–16, 1999.

RUZICKA, K. *et al.* Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. **Plant Cell**, v. 19, p. 2197–2212, 2007.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D.J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6, p. 242, 2005.

SAUTER, M. *et al.* The immediate-early ethylene response gene OsARD1 encodes an acireductone dioxygenase involved in recycling of the ethylene precursor S-adenosylmethionine. **The Plant Journal**, v.44, p. 718–729, 2005.

SHRESTHA, R. K.; J. K. LADHA. Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by ¹⁵N dilution. **Soil Science Society America Journal**, v. 60, p. 1815-1821, 1996.

SHOJIMA, S. *et al.* Biosynthesis of Phytosiderophores: In Vitro Biosynthesis of 2'-Deoxymugineic Acid from L-Methionine and Nicotianamine. *Plant Physiology*, v. 93, p. 1497–1503, 1990.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1096, 1984.

SONG, Y.; YOU, J. ; XIONG, L. Characterization of OsIAA1 gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis. **Plant Molecular Biology**, v. 70, p. 297–309, 2009.

SOUZA, A.L.F. *et al.* The involvement of the nif-associated ferredoxin-like genes *fdxA* and *fdxN* of *Herbaspirillum seropedicae* in nitrogen fixation. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 77–83, 2010.

SOUZA, E.M. *et al.* Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **Journal of bacteriology**, v. 181, p. 681–684, 1999.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, 2011.

STEC, B. Plant thionins - the structural perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1370–1385, 2006.

SUKUMAR, P. *et al.* Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 909-919, 2012.

SWARUP, R. *et al.* Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. **Plant Cell**, v. 19, p. 2186–2196, 2007.

TADRA-SFEIR, M. Z. *et al.* Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis 3 in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2180-2183, 2011.

TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p.1387–1404, 2007.

TAKAGI, S. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, p. 423–433, 1976.

TAKAGI, S.; NOMOTO, K.; TAKEMOTO, T. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 7, p. 469–477, 1984.

TAKEMOTO, D.; HAYASHI, M.; NORIYUKI, D.; NISHIMURA, M.; KAWAKITA, K. Molecular cloning of a defense-response cytochrome P450 gene from tobacco. **Plant Cell Physiology**, v. 40, p. 1232–1242, 1999.

TATUSOV, R.L. *et al.* The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 41, 2003.

UMALI-GARCIA, M. *et al.* Association of *Azospirillum* with grass roots. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, p.219–226, 1980.

VENUGOPAL, S.C. *et al.* Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. **PLoS Genetics**, v. 5, p. e1000545, 2009.

VERHAGE, A.; van WEES, S.C.; PIETERSE, C.M. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? **Plant Physiology**, v. 154, p. 536–540, 2010.

VIGEOLAS, H.; HUHN, D.; GEIGENBERGER, P. Nonsymbiotic Hemoglobin-2 Leads to an Elevated Energy State and to a Combined Increase in Polyunsaturated Fatty Acids and Total Oil Content When Overexpressed in Developing Seeds of Transgenic *Arabidopsis* Plants1[OA]. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1435–1444, 2011.

VINAGRE, F. *et al.* SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 559–569, 2006.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 177–206, 2009.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 23.1–23.36, 2013.

XU, H. *et al.* Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. **PLoS ONE**, v. 7, p. e30646, 2012.

XU, M *et al.* A PIN1 Family Gene, OsPIN1, involved in Auxin-dependent Adventitious Root Emergence and Tillering in Rice. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 1674–1681, 2005.

ZHANG, G. *et al.* Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. **Genome research**, v. 20, p. 646 – 654, 2010.

ZHIMING, Y. *et al.* Root hair-specific expansins modulate root hair elongation in rice. **The Plant Journal**, v. 66, p. 725–734, 2011.

WANG, D. *et al.* Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). **Gene**, v. 394, p.13–24, 2007.

WANG, S. *et al.* Molecular Mechanism of Plant Growth Promotion and Induced Systemic Resistance to Tobacco Mosaic Virus by *Bacillus* spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 1250–1258, 2009.

WANG Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p. 57-63, 2009.

WU, J. *et al.* A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. **Plant Cell**, v. 14. p. 525–535, 2002.

WURIYANGHAN, H. *et al.* The Ethylene Receptor ETR2 Delays Floral Transition and Affects Starch Accumulation in Rice. **The Plant Cell**, v. 21, p. 1473–1494, 2009.

YASUDA, M. *et al.* Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 73, p. 2595-2599, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – Meios de Cultura

Tabela 1 - Solução de Hoagland modificado, sem fonte de nitrogênio

Composição	
KH_2PO_4	1 mM
K_2HPO_4	1 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mM
CaCl_2	2 mM
Solução de micronutrientes ^a	1,0 mL.L ⁻¹
Solução de ferro ^b	1,0 mL.L ⁻¹

a- Solução de micronutrientes	
Composição	g.L⁻¹
H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02

b- Solução de ferro	
Composição**	g.L⁻¹
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13,4
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6

** Dissolver $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e em seguida dissolver $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Ajustar pH entre 6,5 a 7,0 com NaOH 0,1 M.

Tabela 2 - Meio NFbHP-malato

Composição**	g. L⁻¹
KH ₂ PO ₄	7,97
K ₂ HPO ₄	8,9.10 ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0.10 ⁻¹
NaCl	1,0.10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0.10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6.10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0.10 ⁻²
Biotina	1,0.10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,0.10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35. 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8.10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0.10 ⁻⁵
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4.10 ⁻⁴
Malato	5,0

**Como fonte de nitrogênio utiliza-se 20 mmol.L⁻¹ de NH₄Cl para meio sólido e 5 mM de glutamato para meio líquido. A solução de NH₄Cl 1mol.L⁻¹ e a solução de fosfatos são preparadas separadamente, autoclavadas e acrescentadas ao meio NFbHPN-malato no momento do uso.